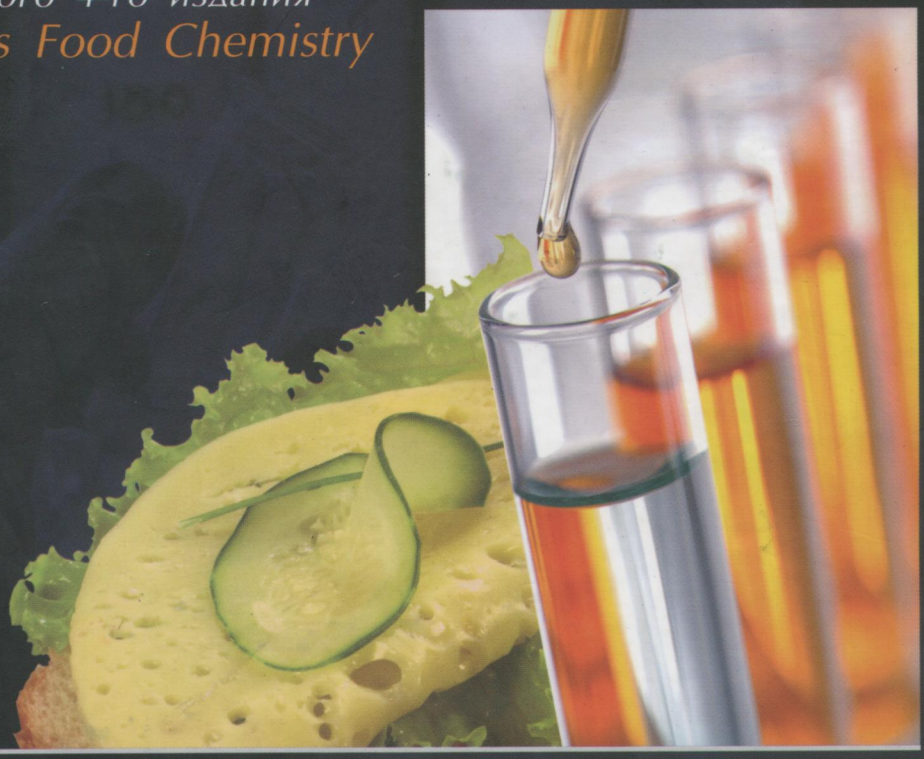
Шринивасан Дамодаран,
Кирк Л. Паркин,
Оуэн Р. Феннема (ред.-сост.)

ХИМИЯ пищевых продуктов

Перевод
с английского 4-го издания
Fennema's Food Chemistry



издательство
ПРОФЕССИЯ

Fennema's Food Chemistry

Fourth Edition

edited by
Srinivasan Damodaran
Kirk L. Parkin
Owen R. Fennema



CRC Press
Taylor & Francis Group
Boca Raton London New York

CRC Press is an imprint of the
Taylor & Francis Group, an **Informa** business

Химия пищевых продуктов

Перевод с англ. яз. 4-го издания

Редакторы-составители:
Шринивасан Дамодаран
Кирк Л. Паркин
Оуэн Р. Феннема

Санкт-Петербург
Издательство ПРОФЕССИЯ
2012

УДК 664
ББК 36-1
Х46

Х46 Химия пищевых продуктов / Ш. Дамодаран, К. Л. Паркин, О. Р. Феннема (ред.-сост.). — Перев. с англ. — СПб. ИД «Профессия», 2012. – 1040 с., ил., табл.

ISBN 978-5-904757-24-3
ISBN 978-0-8493-9272-6 (США)

Один из наиболее авторитетных справочников по пищевой химии состоит из трех частей: Основные компоненты пищи, Минорные компоненты пищи и Пищевые системы.

В первой части рассмотрены вода и лед, углеводы, липиды, аминокислоты и белки, а также ферменты. Во второй части представлены витамины, минеральные вещества, пищевые красители, вкусоароматические вещества, пищевые добавки и технологические вспомогательные средства, а также биоактивные вещества. Третья часть посвящена рассмотрению пищевых дисперсных систем, взаимодействию компонентов пищевых систем, физико-химическим свойствам молока, физиологии и биохимии мышечных и растительных тканей, а также применению биотехнологий в производстве пищевых продуктов, в том числе генно-модифицированных.

Перевод на русский язык выполнен под научной редакцией ведущих специалистов ФГБУ «НИИ питания» РАМН.

Книга предназначена для широкого круга специалистов пищевой промышленности и химиков, специализирующихся по проблемам пищевой химии. Она будет полезна также студентам, аспирантам и преподавателям профильных вузов.

УДК 664
ББК 36.1

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

All rights reserved
Authorized translation from English language edition published by CRC Press, part of Taylor & Francis Group LLC

ISBN 978-5-904757-24-3
ISBN 978-0-8493-9272-6 (США)

© Taylor & Francis Group, LLC, 2008
© Издательский дом «Профессия», перевод, оформление, 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию 7
Предисловие. 9
Сведения о редакторах-составителях и авторах 10
Сведения об авторах отдельных глав 11
1. Введение в химию пищевых продуктов. 13
2. Вода и лед 29
4. Жиры 154
5. Аминокислоты, пептиды и белки 211
6. Ферменты 313
7. Витамины. 413
8. Минеральные вещества. 485
9. Красящие вещества. 528
10. Вкусоароматические вещества 587
11. Пищевые добавки. 631
12. Биоактивные вещества. Нутрицевтики и токсичные соединения 692

14. Физические и химические взаимодействия компонентов в пищевых системах. 781

15. Свойства молока. 813

16. Физиология и химия съедобных мышечных тканей 848

17. Физиология съедобных частей растения после сбора урожая. 897

18. Влияние биотехнологий на продовольственные ресурсы и качество пищевых продуктов. 970

Предметный указатель 1024

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Общеизвестно, что здоровье человека в существенной степени зависит от характера питания. Нарушения питания являются одним из важнейших факторов развития целого ряда социально-значимых заболеваний, таких как заболевания сердечно-сосудистой системы, ожирение, сахарный диабет, онкологические заболевания и т. п., приводящие к преждевременной инвалидизации и сокращению ожидаемой продолжительности жизни. В случае же детей, особенно раннего возраста, правильное питание — это вопрос жизни и смерти, здоровья или нездоровья на всю оставшуюся жизнь.

Вместе с тем фактор питания является также наиболее мощным и эффективным рычагом сохранения и улучшения здоровья, увеличения продолжительности жизни, ее активного периода, повышения работоспособности. Именно поэтому вопросы здорового питания как важнейшего фактора формирования здорового образа жизни и профилактики неинфекционных заболеваний находится в центре внимания не только медицинской общественности, но и государства.

Вопросы обеспечения здорового питания поставлены в Московской декларации, принятой по итогам работы «Первой глобальной министерской конференции по здоровому образу жизни и неинфекционным заболеваниям» (28–29 апреля 2011 г., г. Москва), а также в «Политической декларации совещания высокого уровня Генеральной Ассамблеи ООН по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с ними» (A/RES/66/2, 24 января 2011 г.). В одном из первых Указов Президента РФ В. В. Путина (№ 598 от 07 мая 2012 г., «О совершенствовании государственной политики в сфере здравоохранения») в качестве первоочередных задач Правительству РФ поручено обеспечить «реализацию мероприятий по формированию здорового образа жизни граждан Российской Федерации, включая популяризацию культуры здорового питания...», а также утвердить «план мероприятий по реализации Основ государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года».

В настоящее время интенсивное использование благ цивилизации в экономически развитых странах привело к существенному снижению энерготрат населения: в эволюционном плане человек обогнал природу, резко снизив свои потребности в энергии, при этом сохранив прежнюю потребность в микронутриентах. Это означает, что рацион современного человека должен состоять из пищевых продуктов со сниженной энергетической ценностью, но повышенной пищевой плотностью, то есть на единицу калорийности должно приходиться максимально возможное количество необходимых нутриентов, в том числе и микронутриентов. Только в таких условиях возможно выдержать необходимый баланс и удовлетворить физиологические потребности человека в жизненно важных пищевых и биологически активных веществах. Этого можно достичь, изменяя химический состав продовольственного сырья (например, за счет селекции или генетической модификации), но, как представляется, в настоящее время наиболее эффективный путь — это технологическая модификация во время производства, то есть получение пищевого продукта заданного химического состава.

В основе развития таких технологий XXI века должно быть четкое представление об исходном химическом составе продовольственного сырья и пищевых продуктов со всеми его вариациями, возникающими из-за видовых, сортовых, региональных различий, особенностей условий окружающей среды, применяемых технологий и пр.

Без знаний химического состава пищевых продуктов невозможно правильно оценить соответствие рациона физиологическим потребностям человека, оценить состояние его пищевого статуса. Особенно важно иметь данные о химическом составе пищевых продуктов для больных людей, в том числе страдающих генетически обусловленными заболеваниями, когда направленными изменениями в химическом составе пищевых продуктов можно сделать их жизнь полноценной (например, использование при фенилкетонурии пищевых продуктов, не содержащих фенилаланин).

Работа по изучению химического состава пищевых продуктов должна проводиться непрерывно и не может быть когда-либо завершена. Химический состав — это постоянно меняющаяся величина, и всего за 5–10 лет благодаря развитию технологий существенно меняется ассортимент пищевых продуктов. Одновременно с изменениями в пищевой промышленности совершенствуется и приборная база, открываются

новые возможности для более точной оценки химического состава. Все это требует проведения новых систематических исследований, создания и обновления необходимых баз данных о химическом составе пищевых продуктов.

Именно этому посвящена книга «Химия пищевых продуктов», в которой системно изложены все современные научные представления о том, из чего состоят пищевые продукты и какие изменения в них происходят в процессе производства, технологической обработки и приготовления.

Книга представляет значительный интерес как для медицинских работников, гигиенистов, специалистов в области питания здорового и больного человека, так и для специалистов, занятых в различных областях агропромышленного комплекса, начиная от производителей сельскохозяйственного сырья и селекционеров до технологов пищевой промышленности, специалистов общественного питания. Знания химического состава пищевых продуктов необходимы как для организации питания в организованных коллективах (детские сады, школы, лечебные учреждения и пр.), так и при составлении индивидуальных рационов.

Несомненно, что предлагаемый читателю перевод на русский язык всемирно известной «Химии пищевых продуктов Феннема» должен стать настольной книгой не только ученых, химиков и технологов пищевых производств, но и специалистов-диетологов лечебно-профилактических учреждений, где персонифицированное питание больного является неотъемлемой частью лечения. Книга также будет интересна всем людям, интересующимся современными достижениями в области пищевой химии и следящим за своим питанием.

Директор ФГБУ «НИИ питания» РАМН,
академик РАМН В. А. Тутельян

ПРЕДИСЛОВИЕ

С момента выхода в свет 3-го издания этой книги прошло уже 10 лет, и ускоренное развитие биологических наук потребовало внести в текст дополнения и изменения. Мы полностью признаем заслуги проф. Оуэна Феннема в подготовке этой книги и вообще в области химии пищевых продуктов. Первое издание, вышедшее более 30 лет назад (в 1976 г.) заполнило существовавшую в те времена нишу в области фундаментальных трудов, способных служить как учебным пособием, так и авторитетным справочником для специалистов. Мы считаем, что это издание правильнее было бы называть «Химией пищевых продуктов Феннема», так как оно основано именно на его трудах в этой области, нашедших отражение в первых трех изданиях.

После выхода в 1996 г. проф. Феннема «на пенсию» он продолжает вести активную деятельность, переключившись на более «земные» ее виды, связанные в основном с поездками по миру, деревянными поделками и выдувом стекла. При подготовке этого издания проф. Феннема вел большую работу, но выполнение большинства повседневных редакторских задач он поручил нам. Мы были очень польщены этим доверием и прекрасно осознавали те большие ожидания, которые читатели связывали с выпуском этого нового издания. При этом мы были обязаны сохранить высочайшие стандарты, заложенные проф. Феннема в саму концепцию этой книги.

В настоящем издании не только изменился коллектив редакторов-составителей, но и были привлечены новые авторы отдельных глав, посвященных в частности, воде и льду, углеводам, липидам, ферментам и пищевым красителям. Некоторые главы были полностью переработаны и получили новые названия. Это касается, в частности, глав о физиологии съедобных мышечных и растительных тканей, о биоактивных веществах, а также о пищевых системах (естественно, подготовленных новыми авторами). Была добавлена и совершенно новая глава о влиянии биотехнологий на пищевое сырье.

Мы в неоплатном долгу перед всеми авторами отдельных глав, проявивших в работе с новыми редакторами огромное терпение и профессионализм и уделивших большое внимание целям подготовки нового издания этого фундаментального труда. Нам остается только надеяться, что он окажется полезным и для новых читателей, и для специалистов, уже знакомых с предыдущими изданиями этой книги. Мы будем очень признательны им за конструктивные предложения и замечания, а также за указания на неизбежные в таком труде опечатки.

Шринивасан Дамодаран и Кирк Паркин, г. Мэдисон, штат Висконсин, США

СВЕДЕНИЯ О РЕДАКТОРАХ-СОСТАВИТЕЛЯХ И АВТОРАХ

Оуэн Р. Феннема *(Owen R. Fennema)* — профессор пищевой химии факультета пищевых наук Висконсинского университета (г. Мэдисон). Он является соавтором книг «*Low Temperature Foods and Living Matter*» (вместе с Уильямом Д. Поури и Элмером Г. Мартом) и «*Principles of Food Science, Part II: Physical Principles of Food Preservation*» (вместе с Маркусом Карелом и Дэрилом Б. Лундом), изданных издательством *Marcel Decker, Inc.*, а также автором и соавтором более 175 работ, посвященных химии пищевых продуктов, низкотемпературным способам их сохранения и биологическим аспектам, характеристикам воды и льда, съедобных пленок и покрытий, а также взаимодействиям липидов и пищевых волокон. Будучи редактором-консультантом серии книг по пищевым наукам и технологиям издательства *Marcel Decker, Inc.*, он является также научным сотрудником Института пищевых технологов и Отдела пищевой химии Американского химического общества, членом Американского Института Питания и других научных обществ. В 1950 г. д-р Феннема получил степень бакалавра по сельскому хозяйству в Канзасском университете, магистерскую степень в области молочной промышленности (в 1951 г.) и в 1960 г. — докторскую степень по пищевым наукам и биохимии в Висконсинском университете.

Шринивасан Дамодаран (*Srinivasan Damodaran*) — профессор пищевой химии и декан факультета пищевых наук Висконсинского университета (г. Мэдисон). Он является редактором-составителем книг «*Food Proteins and Lipids*» и «*Food Proteins and Their Application*» (в последнем случае вместе с Аленом Парафом), изданных издательством *Marcel Decker, Inc.*, а также обладателем 6 патентов и соавтором более 125 работ, посвященных химии белка, ферментным технологиям, коллоидным системам, технологиям и биоразлагаемым полимерам. Он является также научным сотрудником Отдела пищевой химии Американского химического общества и членом Института пищевых наук и Американского Общества нефтяных химиков. Кроме того, он является членом редколлегии журнала *Food Boiphysics*. Д-р Дамодаран в 1971 г. получил степень бакалавра по химии в индийском Мадрасском университете, магистерскую степень в области пищевых технологий (в 1975 г.) в Мизорском университете в Индии, а в 1981 г. — докторскую степень в Корнелльском университете (г. Итака, штат Нью-Йорк, США).

Кирк Л. Паркин (*Kirk L. Parkin*) уже более 21 года является профессором факультета пищевых наук Висконсинского университета (г. Мэдисон). В 2003 г. он был избран членом отделения сельскохозяйственной и пищевой химии Американского химического общества. Его научные и преподавательские интересы включают вопросы пищевой химии и биохимии. Проф. Паркин опубликовал более 80 научных статей в области биохимии морепродуктов, физиологии растений после сбора урожая и переработки плодоовощной продукции, фундаментальной и прикладной энзимологии, а в последнее время он занимается вопросами использования в пищевых продуктах биоактивных веществ растительного происхождения. В Висконсинском университете он ведет для студентов курсы пищевой химии, включая лабораторные занятия, а на уровне постдипломного образования — курсы по ферментам и липидам пищевых продуктов. Проф. Паркин является научным руководителем 10 докторских и 17 магистерских диссертаций, а также входит в редколлегии таких известных научных журналов, как «*Journal of Food Science*», «*Food Research International*», «*Food Biochemistry*» и «*Journal of Food Processing and Preservation*».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ ОТДЕЛЬНЫХ ГЛАВ

James N. BeMiller
Department of Food Science
Purdue University
West Lafayette, Indiana

Jeffrey K. Brecht
Horticultural Sciences Department
University of Florida
Gainesville, Florida

Wen Chiang
Department of Food Science and Human Nutrition
Michigan State University
East Lansing, Michigan

Grady W. Chism
Department of Food Science and Technology
Indiana University–Purdue
Indianapolis, Indiana

Srinivasan Damodaran
Department of Food Science
University of Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin

Eric A. Decker
Department of Food Science
University of Massachusetts
Amherst, Massachusetts

Owen R. Fennema
Department of Food Science
University of Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin

Geetha Ghai
Department of Food Science
Rutgers University
New Brunswick, New Jersey

M. Monica Giusti
Department of Food Science and Technology
The Ohio State University
Columbus, Ohio

Jesse F. Gregory III
Food Science and Human Nutrition Department
University of Florida
Gainesville, Florida

Norman F. Haard
Department of Food Science and Technology
University of California
Davis, California

Chi-Tang Ho
Department of Food Science
Rutgers University
New Brunswick, New Jersey

Kerry C. Huber
University of Idaho
Moscow, Idaho

Robert C. Lindsay
Department of Food Science
University of Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin

D. Julian McClements
Department of Food Science
University of Massachusetts
Amherst, Massachusetts

Dennis D. Miller
Department of Food Science
Cornell University
Ithaca, New York

Martina Newell-McGloughlin
Biotechnology Research and Education Program
University of California-Davis
Davis, California

Kirk L. Parkin
Department of Food Science
University of Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin

Jan Pokorny
Faculty of Food and Biochemical Technology
Institute of Chemical Technology
Prague, Czech Republic

Mohamed M. Rafi
Department of Food Science
Rutgers University
New Brunswick, New Jersey

David S. Reid
Department of Food Science and Technology
University of California
Davis, California

Mark A. Ritenour
Institute of Food and Agricultural Sciences
University of Florida
Gainesville, Florida

Steven J. Schwartz
Department of Food Science and Technology
The Ohio State University
Columbus, Ohio

Zdzisław E. Sikorski
Department of Food Chemistry, Technology, and Biotechnology
Gdansk University of Technology
Gdansk, Poland

Gale Strasburg
Department of Food Science and Human Nutrition
Michigan State University
East Lansing, Michigan

Harold E. Swaisgood
Department of Food Science
North Carolina State University
Raleigh, North Carolina

Ton van Vliet
Wageningen Centre for Food Sciences and Wageningen Agricultural University
Wageningen, The Netherlands

Joachim H. von Elbe
Department of Food Science
University of Wisconsin-Madison
Madison, Wisconsin

Pieter Walstra
Wageningen Centre for Food Sciences and Wageningen Agricultural University
Wageningen, The Netherlands

Youling L. Xiong
Department of Animal and Food Sciences
University of Kentucky
Lexington, Kentucky

1. ВВЕДЕНИЕ В ХИМИЮ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Оуэн Р. Феннема (*Owen R. Fennema*), Шринивасан Дамодаран (*Srinivasan Damodaran*).
Кирк Л. Паркин (*Kirk L. Parkin*)
Перевод В. Д. Широкова под науч. ред. акад. РАМН, д-ра мед. наук, проф. В. А. Тутельяна

Содержание

1.1. Что такое «химия пищевых продуктов»? 13
1.2. Исторический экскурс..... 13
1.3. Подход к изучению химии пищевых продуктов ... 17
1.3.1. Анализ ситуаций, возникающих при хранении и производстве пищевых продуктов . .20
1.4. Социальная роль химиков-пищевиков..... .22
1.4.1. Почему химики-пищевики должны участвовать в решении социальных проблем? .22
1.4.2. Варианты участия в решении социальных проблем..... .23
Литература .25

1.1. Что такое «химия пищевых продуктов»?

Область наук о пищевых продуктах, которую зачастую называют просто «наукой о пище» (*Food Science*), изучает физические, химические и биологические свойства пищевых продуктов и их связь со стабильностью, ценой, качеством, технологией производства, безопасностью, пищевой ценностью, полезностью для здоровья и удобством потребления. Наука о пище — это междисциплинарная отрасль биологических наук, включающая прежде всего микробиологию, химию, биологию и инженерию. Химия пищевых продуктов (основной аспект науки о пище) изучает состав и свойства пищевых продуктов и химические реакции, которым они подвергаются в ходе первичной обработки сырья, производства и хранения. Химия пищевых продуктов тесно связана с химией, биохимией, физиологической химией, ботаникой, зоологией и молекулярной биологией. Химик-пищевик при фактическом изучении и контроле биологических материалов как источников пищи для человека в большой степени полагается на знание вышеупомянутых областей. Знание природных свойств биологических материалов и владение методами их исследования важны как для химиков-пищевиков, так и для биологов. К основным сферам интересов биологов относятся размножение, рост и изменения биологических объектов в условиях окружающей среды, совместимых или частично совместимых с жизнью. В отличие от них пищевые химики имеют дело в основном с мертвыми или умирающими биологическими объектами (в том числе с физиологией растений после сбора урожая и посмертными физиологическими изменениями мышечных тканей), а также с их изменениями в различных условиях. Например, условия, необходимые для поддержания остаточных жизненных процессов, представляют интерес для пищевых химиков при изучении возможности реализации свежих фруктов и овощей, а условия, несовместимые с жизненными процессами, представляют интерес при изучении возможностей длительного хранения (консервирования) пищевых продуктов. Кроме того, химики-пищевики изучают химические свойства разрушенных в ходе переработки тканей (мука, фруктовые и овощные соки, выделенные и измененные компоненты, переработанные пищевые продукты), одноклеточных источников пищи (яйца и микроорганизмы) и молока — основной биологической жидкости. Пищевые химики, несмотря на много общего с биологами, имеют совершенно иные интересы, исключительно важные для всего человечества.

1.2. Исторический экскурс

Истоки химии пищевых продуктов до конца не ясны, и детали ее истории еще тщательно не изучались и не документировались. Это не удивительно — ведь химия пищевых продуктов выделилась из других «хи-

мических наук» как самостоятельный раздел химии только XX веке, и вся ее история сильно переплетена с историей агрономической химии, сведения об истории которой тоже нельзя считать исчерпывающими [1, 2]. Предлагаемый краткий экскурс в историю химии пищевых продуктов заведомо неполон и избирателен, однако имеющейся информации вполне достаточно, чтобы понять, когда, где и почему в химии пищевых продуктов произошли важнейшие события, и связать некоторые из них с основными достижениями в обеспечении населения продовольствием, наблюдающимися с начала XVIII века.

Хотя зарождение химии пищевых продуктов восходит к античным временам, большинство важнейших открытий с современной точки зрения приходится на конец XVII века. Прекрасная информация о достижениях того периода содержится в книгах Филби (*Filby*) [3] и Брауна (*Browne*) [1], и большая часть представленной далее информации основывается именно на этих источниках.

В период между 1780-ми и 1850-ми годами были сделаны важные химические открытия, многие из которых прямо или косвенно были связаны с пищевыми продуктами, и эти работы заложили основы современной химии пищевых продуктов. Так, шведский фармацевт Карл Вильгельм Шееле (*Carl Wilhelm Scheele,* 1742–1786) является одним из величайших химиков всех времен. Кроме его наиболее известных открытий хлора, глицерина и кислорода (он открыл их за 3 года до Пристли (*Priestly*), но результаты не были опубликованы), им была выделена лактоза и изучены ее свойства (1780), получена муциновая (слизевая) кислота путем окисления молочной кислоты (1780), задолго до «открытия» Апперта (*Appert*) разработан термический способ консервирования уксуса (1782), выделена лимонная кислота из лимонного сока (1784) и крыжовника (1785), яблочная кислота из яблок (1785) и проверено 20 наиболее распространенных фруктов на присутствие в них лимонной, яблочной и винной кислот (1785). Именно выделение К. В. Шееле новых химических соединений из веществ растительного и животного происхождения считают началом применения точных методов анализа в агрономической химии и химии пищевых продуктов.

Французский химик Антуан Лоран Лавуазье (*Antoine Laurent Lavoisier,* 1743–1794) способствовал окончательному отказу от теории флогистона и сформулировал принципы современной химии. Что касается химии пищевых продуктов, то он установил фундаментальные принципы анализа процесса окисления органических веществ и первым показал, что процесс брожения (ферментации) можно представить в виде уравнения баланса. Он первым предпринял попытку определить химический состав спирта (1784) и сделал один из первых докладов (1786) об органических кислотах различных плодов.

Французский химик (Николас) Теодор де Соссюр ((*Nicolas*) *Theodore de Saussure*) (1767–1845) внес огромный вклад в формализацию и прояснение принципов агрономической химии и химии пищевых продуктов, предложенных Лавуазье. Он также изучал изменения в CO_2 и O_2 при дыхании растений (1804), определял содержание минеральных веществ в растениях методом озоления и сделал первый точный элементный анализ спирта (1807).

Жозеф Луи Гей-Люссак (*Joseph Louis Gay-Lussac,* 1778–1850) и Луи-Жак Тенар (*Louis-Jacques Thenard,* 1777–1857) разработали в 1811 г. первый метод определения массовой доли углерода, водорода и азота в сухих растительных веществах.

Английский химик сэр Хэмфри Дэйви (*Humphrey Davy,* 1778–1829) в 1807–1808 гг. выделил элементы K, Na, Ba, Sr, Ca и Mg. Его вклад в агрономическую химию и химию пищевых продуктов в значительной мере определяется его работами в области агрономической химии, первой из которых в 1813 г. стала *Elements of Agriculture Chemistry, in a Course of Lectures for the Board of Agriculture* [4]. Его книги позволили прояснить и систематизировать существовавшие в то время знания. В первом издании он заявляет:

> Все части растений можно разложить на несколько элементов. Их использование в качестве пищи или в других целях зависит от расположения составных частей этих элементов, которые можно получить или из них самих, или из содержащихся в них соков; именно изучение природы этих веществ составляет существенную часть агрономической химии.

В пятом издании уже сообщается, что растения обычно состоят лишь из семи или восьми элементов, и что «... важнейшие растительные вещества состоят лишь из водорода, углерода и кислорода в различном соотношении, а в небольшом числе случаев — и из их сочетания с азотом» ([5], с. 121).

С работ шведского химика Йёнса Якоба Берцелиуса (*Jons Jacob Berzelius,* 1779–1848) и шотландского химика Томаса Томсона (*Thomas Thomson,* 1773–1852) началось применение формул органических соединений, «без которых анализ органических соединений был бы пустыней без дорог, а анализ пищевых про-

дуктов — неразрешимой задачей» [3]. Берцелиус определил элементный состав почти 2000 соединений, подтвердив тем самым закон сохранения массы, и разработал способы точного определения содержания воды в органических веществах, устранив тем самым недостатки метода Гей-Люссака и Тенара. Томсон же показал, что законы, обусловливающие состав неорганических веществ, в равной степени применимы и к органическим веществам, что стало очень важным открытием.

В книге *Considerations generales sur l'analyse organique et sur ses applications* [6] французский химик Мишель Эжен Шеврёль (*Michel Eugene Chevreul,* 1786–1889) перечисляет известные в то время элементы органических веществ (O, Cl, I, N, S, P, C, Si, H, Al, Mg, Ca, Na, K, Mn и Fe), и перечисляет существовавшие методы органического анализа:

экстрагирование с помощью нейтрального растворителя — воды, спирта или водного раствора эфира;

медленная или фракционная перегонка;

дистилляция паром;

пропускание вещества через раскаленную трубку;

анализ окислением (с использованием кислорода).

Шеврёль стал первым аналитиком органических соединений, а его классический анализ состава животного жира привело к открытию стеариновой и олеиновой кислот.

Д-р Уильям Бомонт (*William Beaumont,* 1785–1853), американский военный хирург, работавший в форте Макино (штат Мичиган), провел классические эксперименты по процессам пищеварения, которые разрушили концепцию, существовавшую еще со времен Гиппократа и согласно которой в пище присутствует единственный питательный компонент. Свои эксперименты он проводил в 1825–1833 гг. на канадце Алексисе Мартине, у которого рана, нанесенная пулей из мушкета, предоставляла прямой доступ к внутренней части желудка и давала возможность вводить туда пищу и исследовать изменения, происходящие при пищеварении [7].

Среди многих примечательных достижений Юстуса фон Либиха (*Justus von Liebig,* 1803–1873) можно выделить доказательство (1837 г.) того, что при брожении уксуса уксусный альдегид является промежуточным соединением между спиртом и уксусной кислотой. В 1842 г. он подразделил все пищевые продукты на азотсодержащие (растительный фибрин, альбумин, казеин, мясо и кровь животных) и на не содержащие азота (жиры, углеводы и спиртные напитки). Хотя эта классификация во многих отношениях и неправильна, она позволила находить важные отличия между различными пищевыми продуктами. Кроме того, фон Либих усовершенствовал методы количественного анализа органических соединений, особенно с использованием сжигания, а в 1847 г. опубликовывал, судя по всему, первую книгу по пищевой химии — *Researches on the Chemistry of Food* [8], в которую вошли результаты его исследований водорастворимых компонентов мышечных тканей (креатина, креатинина, саркозина, инозиновой и молочной кислот и т. п.).

Интересно отметить, что все эти исследования совпали по времени с широким распространением фальсификации пищевых продуктов, так что без преувеличения можно считать, что основным стимулом развития аналитической химии в целом и химии пищевых продуктов, в частности, стала необходимость выявления в продуктах посторонних примесей. К сожалению, достижения химии в некоторой степени способствовали этой фальсификации — недобросовестные поставщики продовольствия смогли извлечь выгоду из доступности химической литературы (в том числе рецептуры фальсифицированных продуктов). На смену старым, малоэффективным эмпирическим способам фальсификации продуктов пришли более эффективные методы, основанные уже на научных принципах. Тем самым история химии пищевых продуктов и их фальсификации тесно переплетена, в связи с чем вполне уместно рассмотреть здесь и историю фальсификации продуктов [3].

В истории фальсификации продуктов в наиболее развитых в настоящее время странах можно выделить три четких стадии. С древних времен и примерно до 1820 г. фальсификация продуктов была не слишком серьезной проблемой, и практически отсутствовала потребность в методах обнаружения фальсификатов. Наиболее очевидное объяснение этого состоит в том, что продовольствие поставляли мелкие предприятия или индивидуальные предприниматели, и сделки заключались преимущественно между конкретными ответственными людьми. Вторая стадия начинается с начала XVIII века, когда существенно возросли частота и объемы преднамеренной фальсификации продуктов. Это можно отнести на счет роста централизации

производства и сбыта продовольствия с соответствующим снижением личной ответственности, а также отчасти на уже упоминавшиеся достижения в области химии. Преднамеренная фальсификация пищевых продуктов оставалось серьезной проблемой примерно до 1920 г., с которого ведет начало третья стадия, когда благодаря усилиям контрольно-регламентирующих органов и появлению эффективных методов выявления фальсификатов удалось снизить частоту и объемы намеренной фальсификации продуктов, и ситуация стала постепенно улучшаться.

Некоторые исследователи считают, что примерно с 1950 г. началась четвертая стадия. Именно с этого времени становятся распространенными пищевые продукты с разрешенными химическими добавками, а продукты глубокой переработки стали составлять основную часть рациона в большинстве промышленно развитых стран. Именно с этих пор загрязнение некоторых пищевых продуктов нежелательными побочными продуктами индустриализации (в том числе ртутью, свинцом и пестицидами) стала вызывать растущую озабоченность общества и контрольно-регламентирующих органов. Обоснованность выделения этой стадии до сих пор остается вопросом дискуссионным, однако действия на ближайшие годы представляются вполне ясными. Озабоченность общества вопросами безопасности и пищевой адекватности продуктов по-прежнему будет служить основными движущими силами изменений (как добровольных, так и вынужденных) способов получения и переработки пищевых продуктов, причем эти меры неизбежны по мере увеличения наших знаний о надлежащих способах обращения с пищевыми продуктами и о максимальном допустимом уровне потребления с пищей нежелательных компонентов.

Начало XVIII века стало периодом особенно сильной озабоченности общества качеством и безопасностью пищи. Эта озабоченность (точнее, возмущение) началась в Англии с публикации Фредерика Аккума (*Frederick Accum*) Трактата о фальсификациях пищевых продуктов [9] и анонимной публикации под заголовком «Смерть в кастрюле» (*Death in the Pot,* [10]). Аккум писал: «На самом деле трудно вспомнить какой-либо продукт, который не может быть фальсифицирован, причем существуют даже вещества, которые почти никогда нельзя купить неподдельными» (с. 14). Далее он отмечает, что «не менее грустно, что широкое полезное использование химии в жизненно важных целях извращено ее превращением во вспомогательное средство для гнусной торговли фальсифицированными продуктами» (с. 20).

Хотя в работе [3] Филби называет обвинения Аккума несколько преувеличенными, в XVIII веке на самом деле преобладала преднамеренная фальсификация некоторых продуктов и ингредиентов, особенно аннато, черного и кайенского перца, эфирных масел, уксуса, лимонного сока, кофе, чая, молока, пива, вин, сахара, сливочного масла, шоколада, хлебобулочных и кондитерских изделий.

Когда в начале XVIII века серьезность фальсификации пищевых продуктов стала для общества очевидной, стали постепенно начали наблюдаться противодействующие тенденции. В результате появилось новое законодательство, объявившее фальсификацию вне закона, что было подкреплено усилиями химиков, направленными на познание присущих пищевым продуктам свойств, химических веществ, обычно используемых для фальсификации, а также способов их обнаружения. Тем самым в период 1820–1850 гг. химия вообще и химия пищевых продуктов в частности стали в Европе очень важными науками. Это стало возможным благодаря уже упоминавшимся работам и в значительной степени стимулировалось появлением научно-исследовательских химических лабораторий в различных университетах, а также новых химических журналов [1]. С тех пор развитие химии пищевых продуктов продолжалось ускоренными темпами (ниже мы перечислим некоторые сделанные открытия и их причины).

В 1860 г. в г. Вееде (Германия) была создана первая опытная сельскохозяйственная станция, директором которой был назначен В. Ханнеберг (*W. Hanneberg*), а главным химиком — Ф. Штохманн (*F. Stohmann*). Основываясь прежде всего на работах химиков, они разработали важную методику рутинного определения основных компонентов пищевых продуктов. Разделяя образец на несколько частей, они определяли содержание влаги, «общего жира», золы и азота. Затем путем умножения содержания азота на коэффициент 6,25 определялось содержание белка. Последовательное расщепление разбавленными кислотой и щелочью давало остаток, названный «общим содержанием пищевых волокон» (клетчатки). Часть, оставшаяся после удаления белка, жира, золы и сырой клетчатки, была названа «безазотистым экстрактом» (именно она считалась усваиваемыми углеводами). К сожалению, довольно долго химики и физиологи ошибочно считали, что полученные по такому способу значения характеризуют пищевую ценность независимо от типа пищевого продукта [11].

В 1871 г. Жан Батист Дюман (*Jean Baptiste Duman,* 1800–1884) предположил, что для поддержания жизни недостаточен рацион, состоящий только из белков, углеводов и жиров.

В 1862 г. Конгрессом США был принят закон о выделении земель сельскохозяйственным колледжам (*Land-Grant College Act*), автором которого был Джастин Смит Моррилл (*Justin Smith Morrill*). Благодаря этому закону в США были организованы сельскохозяйственные колледжи, придавшие значительный импульс профессиональной подготовке агрохимиков и химиков-пищевиков. В том же году было учреждено Министерство земледелия США, первым руководителем которого был назначен Айзек Ньютон (*Isaac Newton*).

В 1863 г. Харви Вашингтон Уайли (*Harvey Washington Wiley*) стал главным химиком Министерства земледелия США. На этом посту он руководил кампанией против неправильно маркированных и фальсифицированных пищевых продуктов, которая завершилась принятием в 1906 г. первого закона США о чистоте пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*Pure Food and Drug Act*).

В 1887 г. после принятия закона Хэтча (Уильям Г. Хэтч был конгрессменом от штата Миссури и Председателем комитета по сельскому хозяйству) в США были созданы опытные сельскохозяйственные станции, превратившиеся впоследствии в крупнейшую в мире национальную систему опытных станций. Это оказало огромное влияние на научные исследования пищевых продуктов.

В первой половине XX века были открыты и описаны большинство незаменимых нутриентов — витамины, минеральные вещества, жирные кислоты, а также некоторые аминокислоты. В середине XX века наиболее важными стали разработка и широкое применение химических веществ для облегчения выращивания, производства и реализации пищевых продуктов.

Из приведенного краткого исторического экскурса следует, что современное обеспечение населения продовольствием выглядит по сравнению с XVIII веком почти совершенным. Вместе с тем вместо старых проблем появились новые, на которые научному сообществу следует обратить внимание для дальнейшего обеспечения полезности и пищевой ценности продуктов, а также для снижения реальных или кажущихся рисков продовольственной безопасности. К подобным проблемам относятся:

- изучение природы, эффективности и влияния непищевых компонентов пищевых продуктов, биологически активных добавок и лекарственных трав и иного растительного сырья, которые помимо обычного пищевого назначения могут использоваться для улучшения здоровья людей (см. об этом главу 12);
- генная инженерия сельскохозяйственных культур (применение генно-модифицированных организмов, ГМО) и выявление ее преимуществ и недостатков относительно рисков для здоровья населения (см. главу 18);
- анализ сравнительной пищевой ценности сельскохозяйственных культур, выращиваемых по традиционной и так называемой органической (то есть экологически чистой) агротехнологии.

1.3. Подход к изучению химии пищевых продуктов

Химики-пищевики обычно заняты определением молекулярных детерминантов свойств материала и способности пищевых матриксов к химическим реакциям. Они стараются эффективно использовать полученную информацию в целях совершенствования рецептур, технологий производства и обеспечения стабильности пищевых продуктов при хранении. Главная задача — выявить причинно-следственные и структурно-функциональные зависимости между различными классами химических соединений. Факты, полученные при исследовании одного пищевого продукта или некоторой модельной системы, можно использовать для лучшего понимания свойств других пищевых продуктов. Аналитический подход к химии пищевых продуктов включает четыре компонента:

- определение свойств, определяющих важнейшие характеристики безопасных для здоровья и высококачественных пищевых продуктов;
- определение химических и биохимических реакций, влияющих на ухудшение качества и/или полезности пищевого продукта для здоровья;
- объединение первых двух пунктов для понимания того, как важнейшие химические и биохимические реакции влияют на качество и безопасность продуктов;

применение полученной информации в различных ситуациях при разработке рецептур, в производстве и в ходе хранения пищевых продуктов.

Основное необходимое условие для любого пищевого продукта — это его безопасность для здоровья. В широком смысле это означает, что в продукте на момент его потребления не должно содержаться никаких вредных химических примесей или микроорганизмов-контаминантов. В промышленности это определение принимает более прикладную форму. Так, в консервной промышленности «промышленная стерильность» слабокислых пищевых продуктов означает отсутствие жизнеспособных спор *Clostridium botulinum*, что, в свою очередь, можно перевести в конкретные режимы термообработки данного продукта в той или иной упаковке. Исходя из этих требований к режимам тепловой обработки, можно выбрать определенные температурно-временные условия, оптимальные для обеспечения качественных показателей. Аналогичным образом в производстве арахисового масла «промышленная безопасность» может рассматриваться в основном как отсутствие афлатоксинов — канцерогенных веществ, продуцируемых определенным видом плесеней. Мероприятия, направленные на предотвращение роста этой плесени, могут как влиять, так и не влиять на другие показатели качества, однако должны применяться те технологические режимы и условия, которые обеспечат прежде всего безопасность продукта.

Перечень важнейших свойств пищевых продуктов и некоторые изменения, которым они могут подвергаться во время переработки и хранения, приведен в табл. 1.1. За исключением пищевой ценности и безопасности для здоровья все они для потребителя очевидны.

На изменение качества или безопасности пищевых продуктов могут влиять разные химические и биохимические реакции. Некоторые важнейшие классы таких реакций приведены в табл. 1.2. В каждом классе реакций в зависимости от конкретного пищевого продукта и конкретных условий обработки сырья, производства или хранения могут использоваться различные реагенты или субстраты. В виде классов реакций они представлены из-за сходства природы субстратов или реагентов у разных пищевых продуктов. Так, реакция неферментативного потемнения включает реакцию карбонильных соединений, образующихся из имеющихся редуцирующих сахаров или в результате реакций типа окисления аскорбиновой кислоты, гидролиза крахмала или окисления липидов. Окисление может затрагивать липиды, белки, витамины или пигменты, а окисление, например, липидов в одном пищевом продукте может затрагивать триацилглицерины, а в другом — фосфолипиды. Все эти реакции будет подробно рассмотрены в других главах этой книги.

Таблица 1.1

Изменения свойств пищевых продуктов, возможные в ходе подготовки сырья, переработки и хранения

Свойства	Изменение
Текстура	Потеря растворимости
	Потеря влагоудерживающей способности
	Черствение (затвердевание)
	Размягчение
Вкус и аромат	Развитие (появление):
	прогорклости (гидролитической или окислительной);
	«вареного» или карамельного привкусов;
	прочих побочных привкусов;
	желаемого вкуса и аромата
Цвет	Потемнение
	Обесцвечивание
	Развитие желаемого цвета (например, золотисто-коричневого у хлебобулочных изделий)
Пищевая ценность	Потери, разрушение или изменение биодоступности белков, жиров, витаминов, минеральных веществ и других компонентов, полезных для здоровья
Безопасность для здоровья	Образование токсичных веществ
	Образование полезных для здоровья веществ
	Инактивация токсичных веществ

Таблица 1.2

Некоторые химические и биохимические реакции, приводящие к изменению качества или безопасности пищевых продуктов

Тип реакции	Примеры
Неферментативное потемнение	Хлебобулочные изделия, сухие продукты и продукты со средним содержанием влаги
Ферментативное потемнение	Нарезанные фрукты и некоторые овощи
Окисление	Окисление липидов (с образованием постороннего вкуса и запаха), разложение витаминов, обесцвечивание пигментов, окисление белков (с потерей пищевой ценности)
Гидролиз	Липиды, белки, витамины, углеводы, пигменты
Взаимодействия металлов	Комплексообразование (антоцианы), потеря хлорофиллом магния, катализ окисления
Изомеризация липидов	Переход цис-измеров несопряженных и сопряженных жирных кислот в *транс*-изомеры
Образование циклических соединений липидов	Образование моноциклических производных жирных кислот
Окисление и полимеризация липидов	Вспенивание при жарке во фритюре
Денатурация белков	Коагуляция яичного белка, инактивация ферментов
Сшивка белков	Потеря пищевой ценности при щелочной обработке
Синтез и разложение полисахаридов	Наблюдается в растительном сырье после сбора урожая
Гликолитические изменения	Изменения, происходящие в мышечной ткани *post mortem* и в растительных тканях после сбора урожая

Таблица 1.3

Примеры причинно-следственных зависимостей при изменении свойств пищевого продукта в ходе первичной обработки сырья, производства и хранения продукта

Основное событие	Вторичное явление	Задействованное свойство (см. табл. 1.1)
Гидролиз липидов	Реакция свободных жирных кислот с белком	Текстура, вкус и аромат, пищевая ценность
Гидролиз полисахаридов	Реакция сахаров с белком	Текстура, вкус и аромат, цвет, пищевая ценность
Окисление липидов	Реакция продуктов окисления с другими соединениями	Текстура, вкус и аромат, цвет, пищевая ценность; возможность образования токсичных веществ
Побитость фруктов	Разрушение клеток, высвобождение ферментов, доступ кислорода	Текстура, вкус и аромат, цвет, пищевая ценность
Термообработка овощей и фруктов	Нарушение целостности клеточных стенок и мембран, высвобождение кислот, инактивация ферментов	То же
Нагревание мышечной ткани	Денатурация и агрегация белков, инактивация ферментов	
Переход *цис*-изомеров жирных кислот в *транс*-изомеры	Увеличение скорости полимеризации при жарке во фритюре	Избыточное вспенивание во время жарки во фритюре, снижение пищевой ценности и биодоступности жиров, отвердевание фритюрного жира

Изменения, перечисленные в табл. 1.1, вызываются реакциями из табл. 1.3. Сведение воедино информации из этих таблиц помогает понять причины порчи пищевых продуктов. Порча пищевого продукта обычно обусловлена рядом первичных событий, сопровождаемых вторичными явлениями, которые на-

блюдаются как изменение качественных свойств (см. табл. 1.1). Примеры подобных последовательностей приведены в табл. 1.3 (следует иметь в виду, что конкретный показатель качества может меняться в результате нескольких различных основных событий). Последовательности событий из табл. 1.3 можно рассматривать в двух направлениях. Слева направо можно рассматривать конкретное основное событие, связанные с ним вторичные явления и их влияние на качественные свойства. В то же время можно определить вероятную причину (причины) наблюдаемого изменения качества (правый столбец табл. 1.3) путем анализа всех возможных основных событий и последующего выявления с помощью соответствующего химического анализа главного основного события. Построение таких последовательностей полезно тем, что при этом соблюдается аналитический подход к проблемам изменения свойств пищевых продуктов.

Упрощенное представление о реакциях и взаимодействиях основных компонентов пищевого продукта дает рис. 1.1. Основные клеточные пулы липидов (L), углеводов (C), белков (P) и их промежуточных метаболитов обозначены буквами слева. Точный характер этих пулов зависит от физиологического состояния ткани в ходе переработки или хранения, а также от компонентов, присутствующих или добавленных в продукты с отсутствующей клеточной структурой («нетканевые» продукты). Для каждого класса соединений характерен собственный тип порчи. Заслуживает внимания роль карбонильных соединений во многих процессах. Эти соединения образуются в основном при окислении липидов и расщеплении углеводов, приводя к снижению пищевой ценности, образованию побочных привкуса и запаха, а также к изменению цвета. В то же время эти реакции позволяют получить в процессе тепловой обработки многих пищевых продуктов требуемые вкус, аромат и цвет.

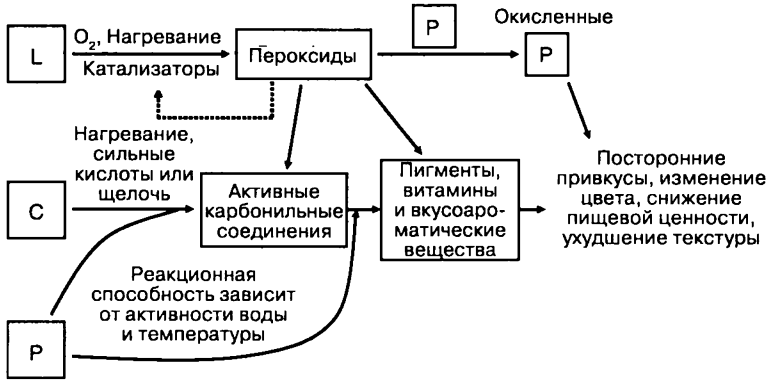


Рис 1.1. Химические взаимодействия между основными компонентами пищевого продукта: L — липидный пул (триацилглицерины, жирные кислоты и фосфолипиды); C — углеводный пул (полисахариды, сахара, органические кислоты и т. д.); P — белковый пул (белки, пептиды, аминокислоты и другие азотсодержащие вещества)

1.3.1. Анализ ситуаций, возникающих при хранении и производстве пищевых продуктов

Рассмотрев свойства высококачественных и безопасных для здоровья пищевых продуктов, важнейшие химические реакции, приводящие к их порче, и зависимость между этими двумя факторами, можно приступить к изложению вопросов применения имеющейся информации в ситуациях, возникающих при хранении и производстве (переработке) пищевых продуктов.

Важнейшие для хранения и производства пищевых продуктов факторы приведены в табл. 1.4. Самым важным из них, возможно, является температура, поскольку она влияет на все типы химических реакций. Влияние температуры на конкретную реакцию можно оценить с помощью уравнения Аррениуса, $k = Ae^{-\Delta E/RT}$. Данные, соответствующие уравнению Аррениуса, при построении графика $\log k$ дают относительно $1/T$ прямую линию. Параметр E — это энергия активации, отражающая изменение свободной энергии, необходимое для перехода химической структурной единицы из основного состояния в переходное, после чего может произойти реакция. Кривыми Аррениуса (рис. 1.2) описывают реакции, происходящие при порче пищевого продукта. Очевидно, что реакции в продукте обычно соответствуют за-

Таблица 1.4

Важнейшие факторы стабильности пищевых продуктов при их первичной обработке, переработке и хранении

Внутренние («продуктовые») факторы	Внешние факторы (окружающей среды)
Химические свойства отдельных компонентов (включая катализаторы), содержание кислорода, активность воды, значения pH, T_g и W_g	Температура (T) Время (t) Состав газовой среды Способы химической, физической или микробиологической обработки Воздействие света Уровень контаминации Уровень механического воздействия

Примечание. Активность воды = p/p_0, где p — парциальное давление водяного пара над пищевым продуктом, а p_0 —давление пара чистой воды; T_g — температура стеклования; W_g — содержание влаги в продукте при T_g.

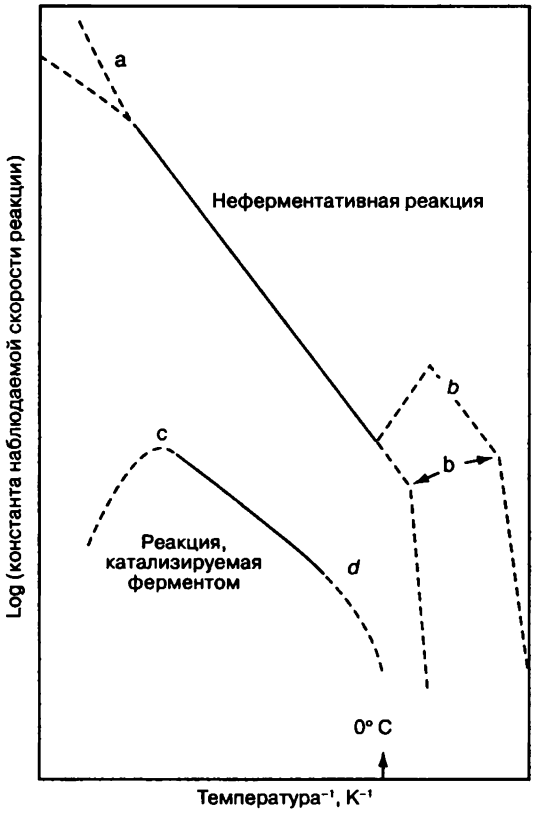


Рис 1.2. Соответствие зависимости Аррениуса для важнейших реакций порчи пищевых продуктов: *a* — выше некоторого значения T могут наблюдаться отклонения от линейного характера зависимости из-за изменения путей реакции; *b* — при температуре ниже точки замерзания системы фаза льда (практически чистого) увеличивается, а жидкая фаза, в которой содержатся все растворенные вещества, уменьшается. Такое увеличение концентрации растворенных веществ в незамороженной фазе в зависимости от типа системы может снизить скорость реакций (усиливает эффект от снижения температуры) или увеличить (противодействуя эффекту понижения температуры, см. главу 2); *c*) — при превышении некоторого критического значения температуры фермент инактивируется, в результате чего скорость реакции резко снижается. Для ферментативной реакции существует определенная температура вблизи точки замерзания воды (*d*), при которой слабые изменения (например, диссоциация комплекса ферментов) могут вызывать резкое снижение скорости реакции

висимости Аррениуса в ограниченном диапазоне температур, а при высоких или низких температурах они отклоняются от нее [12]. Важно помнить, что зависимость Аррениуса для пищевых систем обоснована только для экспериментально проверенного интервала температур. Отклонения от зависимости Аррениуса обусловлены следующими событиями, большинство из которых связано с высокими или низкими температурами:

утрата ферментативной активности;

изменение путей реакции или ее стадий, ограничивающих скорость реакции (на них может также влиять конкурирующие реакции);

изменение физического состояния системы (например, при замораживании);

отсутствие одного или нескольких реагентов.

Еще одним фактором из табл. 1.4 является время. При хранении пищевого продукта зачастую необходимо знать, насколько долго он может сохранять заданный уровень качества. При определении конкретного срока хранения данного продукта требуется знать время суммарных химических и/или микробиологических изменений в течение некоторого срока хранения, и как эти изменения влияют на срок годности или хранения продукта. Переработчикам зачастую требуется знать время, необходимое для инактивации той или иной популяции микроорганизмов, а также время, требуемое для обеспечения заданной степени реакции (например, сколько времени при обжарке чипсов требуется для получения нужного золотистого цвета). Для этого необходимо знать изменение температуры со временем, то есть, dT/dt, так как оно позволяет определить степень изменения скорости реакции при изменении температуры пищевого матрикса в ходе обработки. Если ΔE реакции и температурная кривая для пищевого продукта известны, то интегральный анализ позволяет спрогнозировать чистое накопление продукта реакции. Все это представляет интерес и для пищевых продуктов с несколькими характерными реакциями порчи (например, окисление липидов и неферментативное потемнение). Если продуктами реакции потемнения являются антиоксиданты, то следует знать, насколько относительные скорости этих реакций обусловливают степень их взаимодействия.

Другая переменная, значение pH, влияет на скорость многих химических и ферментативных реакций. Для существенного ингибирования роста микроорганизмов или ферментативных процессов обычно требуются предельные значения pH, а эти условия могут привести к ускорению реакций, катализируемых кислотами или щелочами. И наоборот, даже относительно небольшое изменение значения pH может привести к существенному изменению качества некоторых пищевых продуктов (например, мясных).

Для определения реагентов, доступных для химического превращения, важен состав продукта. Кроме того, важно знать, как клеточные (неклеточные) и гомогенные (гетерогенные) пищевые системы влияют на расположение и реакционную способность реагентов. Для качества особенно важна зависимость между составами сырья и готового продукта. Например, способы обращения с овощами после сбора урожая влияют на содержание в них сахара, что обусловливает степень потемнения при обезвоживании или при жарке во фритюре, а способы обращения с животным сырьем (мышечными тканями животных после убоя) — на степень и скорость гликолиза и разложения АТФ, что обусловливает срок хранения, влагоудерживающую способность (ВУС), жесткость, вкус и цвет мяса. Смешивание сырья может привести к самым неожиданным взаимодействиям (например, темпы окисления могут ускоряться или замедляться в зависимости от количества внесенной соли).

Еще один важный элемент состава пищевых продуктов, определяющий скорость реакций в пищевых продуктах — активность воды (a_w). Многочисленные исследователи показали, что значение a_w сильно влияет на скорость реакций, катализируемых ферментами [13], на окисление липидов [14, 15], неферментативное потемнение [14, 16], гидролиз сахарозы [17], разложение хлорофилла [18] и антоцианов [19] и некоторые другие реакции. Скорости большинства реакций при значениях a_w ниже 0,75–0,85 (диапазон среднего содержания влаги, см. главу 2) имеют тенденцию снижаться. Исключениями из этого правила являются окисление липидов и связанные с ним побочные эффекты (например, изменение цвета каротиноидов), то есть эти реакции при низких значениях a_w ускоряются.

Относительно недавно стало ясно, что температура стеклования T_g продукта и соответствующее ей содержание воды W_g причинно связаны со скоростями событий, ограниченных диффузией. Тем самым значения T_g и W_g имеют отношение к физическим свойствам замороженных и высушенных пищевых про-

дуктов, к условиям сублимационной сушки, к физическим изменениям (кристаллизации, перекристаллизации, клейстеризации и ретроградации крахмала), а также к химическим реакциям, ограниченным диффузией (см. главу 2).

В промышленно переработанных пищевых продуктах их состав можно регулировать путем добавления разрешенных химических веществ (например, подкислителей, комплексообразователей, ароматизаторов или антиоксидантов) или удаления нежелательных реагентов (например, глюкозы из сухого яичного белка).

Состав газовой среды важен в основном в смысле поддержания относительной влажности и содержания кислорода, хотя при хранении жизнеспособных продуктов растительного происхождения также важны этилен и CO_2. К сожалению, в ситуациях, когда желательно удаление кислорода, это условие почти невозможно обеспечить полностью. Вредные последствия от присутствия небольшого количества остаточного кислорода иногда в ходе хранения продукта становятся очевидными. Так, раннее образование небольшого количества дегидроаскорбиновой кислоты (в результате окисления аскорбиновой кислоты) может привести при хранении к неферментативному потемнению (реакции Майяра).

Для некоторых продуктов вредно воздействие света, и в этом случае их следует упаковывать в светонепроницаемый материал или по возможности контролировать интенсивность света и длину волн.

Для решения проблем рецептуры (состава), технологии производства и стабильности пищевых продуктов при хранении химики-пищевики должны уметь обобщать информацию о показателях качества пищевых продуктов, реакциях порчи, к которым чувствительны те или иные пищевые продукты, а также о факторах, влияющих на типы и скорости реакций порчи.

1.4. Социальная роль химиков-пищевиков

1.4.1. Почему химики-пищевики должны участвовать в решении социальных проблем?

Химики-пищевики должны участвовать в решении социальных проблем, включая технологически обусловленные, то есть «техносоциальные», по следующим причинам:

- они получили соответствующее высшее образование и владеют специальными знаниями и умениями, которые возлагают на них высокую ответственность;
- их работа влияет на адекватность поставок пищевых ресурсов, полезность пищевых продуктов для здоровья населения, на стоимость продуктов, количество и удаление производственных отходов, на энерго- и водопотребление и нормативное регулирование производства пищевых продуктов, а поскольку от этих факторов зависит общее благосостояние населения, то вполне естественно, что химики-пищевики обязаны работать на благо общества;
- если химики-пищевики не будут участвовать в решении техносоциальных проблем, то возобладают мнения других людей — ученых других специальностей, профессиональных лоббистов, представителей средств массовой информации, активистов из числа потребителей пищевых продуктов, просто шарлатанов и фанатичных противников технического прогресса. Многие из них гораздо менее квалифицированы, чем химики-пищевики, а некоторые просто не имеют права рассуждать о связанных с пищевыми продуктами проблемах из-за своей необразованности;
- химики-пищевики могут и обязаны помочь в разрешении имеющихся и возможных разногласий в области влияния пищевых продуктов на здоровье населения и в общественном мнении относительно развития науки и технологий. Это относится в том числе к активным дискуссиям по безопасности клонированных и генно-модифицированных продуктов, по использованию гормонов роста в животноводстве, по относительной пищевой ценности сельскохозяйственных культур, возделываемых с использованием «органических» и традиционных агротехнических приемов.

1.4.2. Варианты участия в решении социальных проблем

К социальным обязательствам химиков-пищевиков относятся хорошее качество выполнения своей работы, наличие гражданской позиции и соблюдение научной этики, но одного их соблюдения явно недостаточно. Необходимо также содействие в определении того, как полученные научные знания интерпретиру-

ются и используются обществом — это очень важно, но зачастую химики-пищевики этим пренебрегают. Хотя у химиков и других специалистов пищевой промышленности могут быть разные подходы к решению возникающих проблем, для принятия разумных решений их взгляды должны быть услышаны и рассмотрены. Признание этого бесспорного факта ставит очевидный вопрос: «Что именно химики-пищевики должны сделать, чтобы должным образом исполнить эти свои обязанности?»

Для этого необходимо предпринимать следующие шаги:

- участвовать в работе профессиональных обществ и объединений;

  участвовать в качестве приглашенных членов в работе государственных консультативных комитетов;

  проявлять личные инициативы по линии общественной деятельности.

К последнему виду деятельности относятся, в том числе, публикации в средствах массовой информации, обращения в государственные контрольно-регламентирующие и законодательные органы, к руководителям фирм и высших учебных заведений, ведение диалога с объединениями граждан, включая выступления перед школьниками старших классов, а также иная просветительская работа.

Основной целью этих усилий являются просвещение населения в области пищевых продуктов и питания, в том числе повышение его способности разумно оценивать получаемую информацию. Это довольно трудеая задача, поскольку у значительной части населения укоренились ложные представления о пище и «правильном» питании; кроме того, многие в понятие «пища» вкладывают значительно более широкий смысл, чем химики-пищевики. Для некоторых пища и пищевые продукты могут быть неотъемлемой частью религиозной практики, культурного наследия, иметь ритуальную и социальную символику, а также способом достижения хорошего физиологического самочувствия, а подобное отношение, как правило, не способствует приобретению способности правильно оценивать пищевые продукты и режимы питания с научной точки зрения.

Одним из наиболее спорных вопросов, который еще не получил в обществе научно обоснованной оценки, является использование химических веществ для модификации пищевых продуктов. «Хемофобия», то есть страх перед «химией», характерен для значительной части населения, что в умах многих привело к тому, что любые пищевые добавки считаются факторами риска, а это не соответствует научным данным. В популярной литературе с обескураживающей легкостью появляются материалы, авторы которых заявляют, что вся американская еда просто напичкана ядами, что делает ее в лучшем случае вредной, а в худшем — опасной для жизни. По мнению таких авторов, самое страшное — эта та манера, с которой алчные промышленники отравляют пищевые продукты для получения прибыли, а неэффективное Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*FDA*) спокойно взирает на все это. Следует ли верить таким публикациям? Ответ на этот вопрос в значительной степени зависит от степени доверия и авторитетности специалиста, рассматривающего данную научную проблему. Доверие к нему зависит от его образованности, профессиональной подготовленности, практического опыта и научного вклада в данную область знаний. Активность ученых может проявляться в форме научных исследований, получения новых знаний, а также обзоров и/или интерпретации уже имеющихся научных фактов. Кроме того, доверие основывается и на стремлении специалиста к объективности, что требует рассмотрения альтернативных точек зрения и анализа максимально возможного объема имеющихся знаний о предмете (вместо отсылок на факты и мнения, которые подкрепляют только его точку зрения). Научное знание накапливается благодаря публикациям результатов исследований в научной литературе, в том числе в рецензируемых авторитетных журналах, придерживающихся самых высоких профессиональных и этических стандартов представления информации.

Что касается студентов и молодых ученых, многие современные проблемы достоверности информации связана с огромным количеством информации (в том числе научной), легко доступной через интернет. Зачастую у этой информации отсутствует авторство, а некоторые сайты не могут рассматриваться как надежный и авторитетный источник информации. Иногда те или иные сведения помещают на сайт для продвижения конкретной точки зрения, то есть они являются элементом маркетинговой кампании, проводимой с целью повлиять на мнение пользователя или привычки покупателей. Несмотря на то что некоторые сведения, представленные в интернете, являются столь же авторитетными, как и информация,

распространяемая специализированными издательствами, к информации из интернета следует относиться с большой осторожностью.

Несмотря на продолжающийся рост и углубление знаний в области пищевых продуктов и питания, многие вопросы, в том числе относительно безопасности пищевых продуктов для здоровья, остаются дискуссионными. Значительное большинство специалистов придерживаются мнения, что наша пища относительно безопасна и обладает необходимой пищевой ценностью, а допущенные к использованию пищевые добавки не повышают риск для здоровья потребителей [20–30], хотя необходимо отслеживать возможные негативные воздействия. Вместе с тем относительно небольшая группа ученых считает, что наша пища слишком опасна, особенно если в ней используются некоторые разрешенные добавки.

Научные дискуссии в последнее время расширились и стали охватывать в том числе вопросы безопасности генно-модифицированных продуктов (как для здоровья населения, так и экологии), относительной пищевой ценности «органически» и традиционно выращенных сельскохозяйственных культур, а также правомерность помещения на этикетках заявлений о полезности продукта для здоровья (это относится и к БАДам). Научные знания накапливаются дискретно и намного медленнее, чем этого хотелось бы для ведения последующих дебатов. Роль ученых — постоянно участвовать в этом процессе и способствовать научной объективности всех участвующих в споре сторон так, чтобы высокопоставленные политики были хорошо информированы и могли принимать адекватные решения.

Итак, ученые имеют больше обязательств перед обществом, чем люди без системного научного образования. Ученые обязаны продуктивно генерировать знания, причем с соблюдением этических норм, но только этого недостаточно. Специалисты должны обеспечить также использование научных знаний с максимальной пользой для общества, а для этого требуется, чтобы ученые не только отвечали за высокое качество своей работы и ее соответствие этическим стандартам, но и занимались активной просветительской деятельностью.

Литература

1. Browne C. A. *A Source Book of Agricultural Chemistry*. — Waltham, MA: Chronica Botanica Co., 1944.
2. Hide A. J. *The Development of Modern Chemistry*. — NY: Harper & Row, 1964.
3. Filby F. A. A *History of Food Adulteration and Analysis*. — London: George Allen and Unwin, 1934.
4. Davy H. *Elements of Agricultural Chemistry // A Course of Lectures for the Board of Agriculture*. — London: Longman, Hurst, Rees, Orme and Brown, 1813. Цит. по [1].
5. Davy H. *Elements of Agricultural Chemistry*. — 5th ed. — London: Longman, Rees, Orme, Brown, Green and Longman, 1936.
6. Chevreul M. E. *Considerations generales sur l 'analyse organique et sur ses applications*. Цит. По [3].
7. Beaumont W. *Experiments and Observations of the Gastric Juice and the Physiology of Digestion*. — Plattsburgh, NY: F. P. Allen, 1833.
8. Liebig J., von. *Researches on the Chemistry of Food*, edited from the author's manuscript by William Gregory. — London: Taylor and Walton, 1847. Цит. по [1].
9. Accum F. *A Treatise on Adulteration of Food, and Culinary Poisons*, 1920. — Facsimile reprint by Mallinckrodt Chemical Works. — St. Louis, MO, 1966.
10. *Death in the Pot*, 1831. Цит. по [3].
11. McCollum E. V. *The history of nutrition // World Rev. Nutr. Diet.*, 1959, 7, p. 1–27.
12. McWeeny D. J. Reactions in food systems: negative temperature coefficients and other abnormal temperature effects // *J. Food Technol.*, 1968, 3, p. 15–30.
13. Acker L. W. Water activity and enzyme activity // *Food Technol.*, 1969, 23, p. 1257–1270.
14. Labuza T. P., Tannenbaum S. R., Karel M. Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods // *Food Technol.*, 1970, 24, p. 543–550.
15. Quast D. G, Karel M. Effects of environmental factors on the oxidation of potato chips // *J. Food Sci.*, 1972, 37, p. 584–588.
16. Eichner K., Karel M. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions // *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20, p. 218–223.
17. Schoebel T., Tannenbaum S. R., Labuza T. P. Reaction at limited water concentration. 1. Sucrose hydrolysis // *J. Food Sci.*, 1969, 34, p. 324–329.
18. LaJollo, F., Tannenbaum S. R., Labuza T. P. Reaction at limited water concentration. 2. Chlorophyll degradation // *J. Food Sci.*, 1971, 36, p. 850–853.

19. Erlandson J. A., Wrolstad R. E. Degradation of anthocyanins at limited water concentration // *J. Food Sci.*, 1972, 37, p. 592–595.
20. Clydesdale F. M., Francis F. J. *Food, Nutrition and You.* — Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1977.
21. Hall R. L. Food additives // *Food and People* / D. Kirk, I. K. Eliason (eds.). — San Francisco, CA: Boyd and Fraser, 1982. — P. 148–156.
22. Jukes T. H. How safe is our food supply? // *Arch. Intern. Med.*, 1978, 138, p. 112–114.
23. Mayer J. *A Diet for Living.* — NY: David McKay, Inc., 1975.
24. Stare F. J., Whelan E. M. *Eat OK — Feel OK.* — North Quincy, MA: Christopher Publishing House, 1978.
25. Taylor R. J. *Food Additives.* — NY: John Wiley & Sons, 1980.
26. Whelan E. M. *Toxic Terror.* — Buffalo, NY: Prometheus Books, 1993.
27. Watson D. H. *Food Chemical Safety. Volume 1: Contaminants; Volume 2: Additives.* — Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd., 2001.
28. Roberts C. A. *The Food Safety Information Handbook.* — Westport, CT: Oryx Press, 2001.
29. Riviere J. H. *Chemical Food Safety —A Scientist's Perspective.* — Ames: Iowa State Press, 2002.
30. Wilcock A., Pun, M., Khanona J., Aung M. Consumer attitudes, knowledge and behaviour: a review of food safety issues // *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, 75, p. 56–66.

Часть I

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

2. ВОДА И ЛЕД

Дэвид С. Рейд (*David S. Reid*), Оуэн Р. Феннема (*Owen R. Fennema*)
Перевод В. Д. Широкова под науч. ред. д-ра мед. наук, засл. раб. высшей школы, проф. Б. П. Суханова

Содержание

2.1. Введение. . 30
2.2. Физические свойства воды и льда . . . 30
2.3. Молекула воды . . . 30
2.4. Ассоциация молекул воды . 32
2.5. Диссоциация молекул воды . 34
2.6. Структуры систем чистой воды . 34
2.6.1. Структура льда 34
2.6.2. Структура воды в жидком состоянии 37
2.7. Фазовые соотношения чистой воды . . 39
2.8. Вода с растворенными в ней веществами. . 39
2.8.1. Лед с присутствующими в нем растворенными веществами . 41
2.8.2. Взаимодействия «вода – растворенное вещество» в водных растворах 42
2.8.2.1. Макроскопический уровень. . 42
2.8.2.2. Молекулярный уровень. Общие соображения . 43
2.8.2.3. Молекулярный уровень. «Связанная вода» . . . 43
2.8.2.4. Взаимодействия воды с ионами и ионными группами . 44
2.8.2.5. Взаимодействие воды с нейтральными группами, способными к водородному связыванию (с гидрофильными растворенными веществами) . 45
2.8.2.6. Взаимодействие воды с неполярными веществами. . 46
2.9. Активность воды и относительное давление водяного пара. . 50
2.9.1. Введение 50
2.9.2. Определение и измерение. . 51
2.9.3. Температурная зависимость 52
2.10. Молекулярная подвижность и стабильность пищевого продукта 55
2.10.1. Введение . 55
2.10.2. Исторический экскурс 55
2.10.3. Последующие исследования . . . 55
2.10.4. Скорость реакций в растворе. . . . 56
2.10.5. Влияние молекулярной подвижности на стабильность пищевых продуктов 56
2.10.6. Диаграмма состояний 57
2.10.6.1. Введение. 57
2.10.6.2. Интерпретация диаграммы состояний. . 58
2.10.6.3. Взаимодействие состояния равновесия и кинетики . . . 60
2.10.6.4. Распространение этой концепции на сложные пищевые системы 61
2.10.6.5. Подбор допущений 63
2.10.7. Ограничения данной концепции . 63
2.10.8. Практическое применение. . . . 65
2.10.8.1. Построение диаграммы состояний 65
2.10.8.2. Процесс замораживания и замороженные пищевые продукты . 67
2.10.8.3. Процессы сушки 71

2.11. Изотермы сорбции влаги 72
2.11.1. Определения и зоны 72
2.11.2. Температурная зависимость . . 77
2.11.3. Гистерезис 77
2.11.4. Последовательность гидратации белка 78
2.12. Относительное давление пара и стабильность пищевого продукта. 79
2.13. Сравнения различных подходов . 82
2.13.1. Взаимосвязи между подходами к пониманию роли воды в пищевых продуктах, основанными на значениях *RVP*, подвижности молекул и изотерм сорбции влаги. 82
2.14. Заключение 83
Литература . 83

2.1. Введение

При изучении состава пищевых продуктов в большинстве случаев их существенным компонентом оказывается вода. Кроме того, если рассматривать обмен веществ в организме человека, то вода здесь является основным растворителем, в котором происходит этот важнейший для жизни процесс. Чтобы понять центральную роль воды в пищевой химии, следует тщательно изучить природу и свойства воды и водных растворов, а также те многочисленные функции, которые выполняет вода в пищевых системах.

2.2. Физические свойства воды и льда

В качестве первого шага знакомства с водой рассмотрим ее физические свойства (табл. 2.1). При сравнении свойств воды и молекул сходной молекулярной массы и атомного состава (табл. 2.2) можно определить, ведет ли вода себя аналогичным образом или ее поведение отличается от ожидаемого. Эти сравнения показывают [1], что вода характеризуется необычно высокими температурами плавления и кипения; необычно высокими значениями поверхностной энергии, диэлектрической проницаемости, теплоемкости и теплоты фазовых превращений (плавления, парообразования, сублимации). Плотность ее несколько ниже ожидаемой. Кроме того, она проявляет такое необычное свойство, как расширение при застывании. Несмотря на все эти необычные характеристики, она имеет совершенно нормальную (по сравнению с рассчетной) вязкость. Эту очевидную нормальность для явно аномальной по своим свойствам жидкости мы объясним позже.

Примечательны и другие свойства воды. Ее теплопроводность по сравнению с большинством других жидкостей велика, а теплопроводность льда даже больше, чем можно было ожидать для неметаллического твердого вещества. Теплопроводность льда при 0 °С примерно в четыре раза превышает теплопроводность жидкой воды при той же температуре, что свидетельствует о том, что лед проводит тепловую энергию намного быстрее, чем иммобилизованная (например, в мышечной ткани) вода. Так как теплоемкость воды примерно в два раза больше теплоемкости льда, температуропроводность воды и льда различается почти девятикратно [2]. Поскольку температуропроводность характеризует скорость, с которой материал будет подвержен температурному изменению, можно ожидать, что в данной термической окружающей среде скорость изменения температуры льда будет в 9 раз выше, чем у жидкой воды. Эти различия в значениях теплопроводности и диффузности воды и льда дают хорошую основу для понимания: почему при применении одних и тех же перепадов температур мышечные ткани замораживаются быстрее, чем оттаивают [2].

2.3. Молекула воды

Необычные свойства воды предполагают наличие больших сил притяжения между ее молекулами и дают основания полагать, что структуры воды и льда могут быть весьма необычными. Чтобы объяснить особенности и необычное поведение воды и льда, для начала лучше всего рассмотреть природу одиночной молекулы воды, а затем — характеристики кластеров молекул воды увеличенного размера, и только после

Таблица 2.1
Физические свойства воды и льда. По [110]

Свойство	Значение
Молекулярная масса	18,0153
Температура плавления (при 101,3 кПа)	0,00°C
Темература кипения (при 101,3 кПа)	100,00°C
Критическая температура	373,99°C
Критическое давление	22,064 МПа
Температура тройной точки	0,01 °C
Давление в тройной точке	611,73 Па
$\Delta H_{исп}$ при 100 °C	40,647 Вт/моль
$\Delta H_{суб}$ при 0 °C	50,91 кДж/моль
$\Delta H_{пл}$ при 0 °C	6,002 кДж/моль

Другие зависящие от температуры свойства	Температура, °C			
	Лед		Вода	
	−20	0	0	+20
Плотность, г/см³	0,9193	0,9168	0,99984	0,99821
Давление пара, кПа	0,103	0,6113	0,6113	2,3388
Теплоемкость, Дж/г/К	1,9544	2,1009	4,2176	4,1818
Теплопроводность, Вт/м/К	2,433	2,240	0,561	0,5984
Температуропроводность, м²/с	$11,8\times10^{-7}$	$11,7\times10^{-7}$	$1,3\times10^{-7}$	$1,4\times10^{-7}$
Сжимаемость, Па⁻¹		2	4,9	
Диэлектрическая постоянная	98	90	87,9	80,2

Таблица 2.2
Свойства сходных небольших молекул. По [110]

Физические свойства	CH_4	NH_3	H_2O	H_2S	H_2Se	HF
Молекулярная масса	16,04	17,0	18,01	34,08	80,9	20,01
Температура плавления, °C	−182,6	−77,7	0	−86	−60	−83,1
Температура кипения, °C	−161,4	−33,3	100	−61	−41	19,5
$\Delta H_{исп}$, кДж/моль	8,16	23,26	40,71	18,66		

этого — природу объемной системы. Молекулу воды зачастую описывают как состоящую из двух атомов водорода, взаимодействующих с двумя связывающими sp^3-орбиталями кислорода, образуя две ковалентные сигма(σ)–связи 40%-ного ионного характера, каждая из которых имеет энергию диссоциации $4,6\cdot10^2$ кДж/моль. Предполагается, что локализованные молекулярные орбитали остаются симметрично ориентированными относительно первоначальных орбитальных осей, сохраняя примерную структуру тетраэдра. Схематическая модель представлена на рис. 2.1, *a*, а радиусы Ван-дер-Ваальса — на рис. 2.1, *b*. Хотя геометрическое поведение молекул воды, связанных водородными связями, согласуется с этой моделью, предположение об экстенсивной sp^3-гибридизации неподеленных пар все больше и больше оспаривается [3].

В состоянии пара угол связи изолированной молекулы воды равен 104,5°, что близко к совершенному тетраэдрическому углу 109,5°, а радиусы Ван-дер-Ваальса для кислорода и водорода соответственно составляют 1,40 и 1,2 Å [4].

Важно заметить, что представленная выше картина, описывающая только молекулу HOH, является слишком упрощенной. Вещество, которое мы знаем как чистую воду, представляет собой смесь молекул HOH и многих других родственных компонентов. Кроме обычных изотопов кислорода и водорода (^{16}O и ^{1}H) в ней также присутствуют ^{17}O, ^{18}O, ^{2}H (D) и ^{3}H (T), что дает в результате 18 изотопных вариантов молекул воды. Кроме того, в воде присутствуют и водородные ионы (в форме H_3O^+, $H_9O_4^+$), и гидроксильные

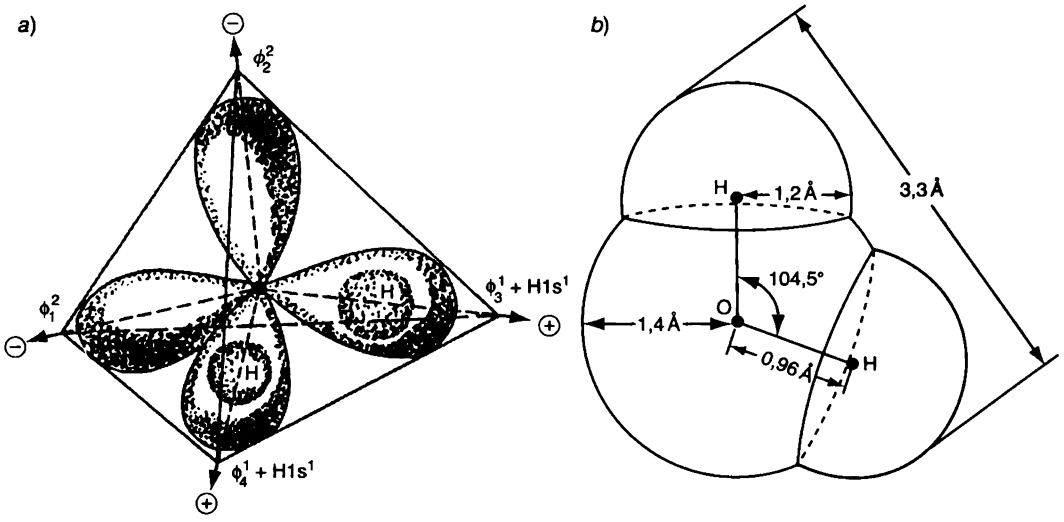


Рис. 2.1. Схематическая модель одиночной молекулы HOH: *a* — возможная sp^3-конфигурация; *b* — радиусы Ван-дер-Ваальса для молекулы HOH в парообразном состоянии

ионы вместе с их изотопными вариантами. Таким образом, «чистая» вода состоит из более 33 химических вариантов HOH, но так как эти варианты присутствуют в незначительных количествах, свойства воды определяются видами HOH.

2.4. Ассоциация молекул воды

V-подобная форма молекулы HOH и полярный характер связи O—H приводят к асимметричному распределению заряда внутри молекулы, и для чистой воды в парообразном состоянии дипольный момент равен 1,84 Д*. Такая полярность создает значительные межмолекулярные силы притяжения, и поэтому ассоциации молекул воды обладают высокой прочностью. Отметим, однако, что необычно большую межмолекулярную силу притяжения воды невозможно полностью объяснить только наличием большого молекулярного дипольного момента. Этого следовало ожидать, так как дипольные моменты являются свойством всей молекулы и не характеризуют степень изолированности индивидуальных зарядов или геометрию молекулы — аспекты, которые важны для интенсивности межмолекулярной ассоциации.

Большие межмолекулярные силы притяжения между молекулами воды могут удовлетворительно объясняться их способностью участвовать во множественных трехмерных ассоциациях на основе водородных связей. По сравнению с ковалентными связями (со средней энергией связи около 335 кДж/моль) водородные связи довольно слабы (обычно 2–40 кДж/моль) и имеют бо́льшую и более переменную длину. Связь «кислород–водород» характеризуется энергией диссоциации около 11–25 кДж/моль и длиной примерно от 1,7 до 2,0 Å, тогда как длина ковалентной связи «кислород–водород» составляет около 1,0 Å [1].

Так как электростатические силы вносят значительный вклад в энергию водородной связи и поскольку электростатическая модель воды довольно проста и для льда дает по существу правильную геометрическую картину молекул HOH, при дальнейшем расмотрении геометрических форм, образующихся при ассоциации молекул HOH, мы будем подчеркивать электростатические эффекты. Этот упрощенный подход полностью отвечает поставленной цели, а для удовлетворительного объяснения других поведенческих характеристик воды (например, влияния неполярных растворенных веществ) он представляется неадекватным и должен быть модифицирован.

Сильно электроотрицательный кислород молекулы воды можно рассматривать как частично отрывающий одиночные электроны от двух ковалентно связанных атомов водорода, тем самым оставляя каждый

* Величину дипольного момента в справочной литературе приводят по имени П. Дебая в дебаях (Д или D); 1 Д = $3{,}33564 \cdot 10^{-30}$ Кл·м. — *Примеч. ред.*

водородный атом с частично положительным зарядом и минимальным электронным экраном, то есть каждый атом водорода обладает некоторыми характеристиками голого протона. Так как орбитали, связывающие водород и кислород, располагаются на двух осях воображаемого тетраэдра (см. рис. 2.1, *a*), то эти две оси допустимо рассматривать как представляющие линии положительной силы (донорские участки водородных связей). Две орбитали неподеленной пары кислорода можно рассматривать как располагающиеся вдоль остальных двух осей тетраэдра и представляющие линии отрицательной силы (акцепторные участки водородных связей). Благодаря этим четырем линиям силы в тетраэдрической ориентации каждая молекула воды может образовывать водородные связи максимум с четырьмя другими молекулами. Получающееся тетраэдрическое расположение представлено на рис. 2.2.

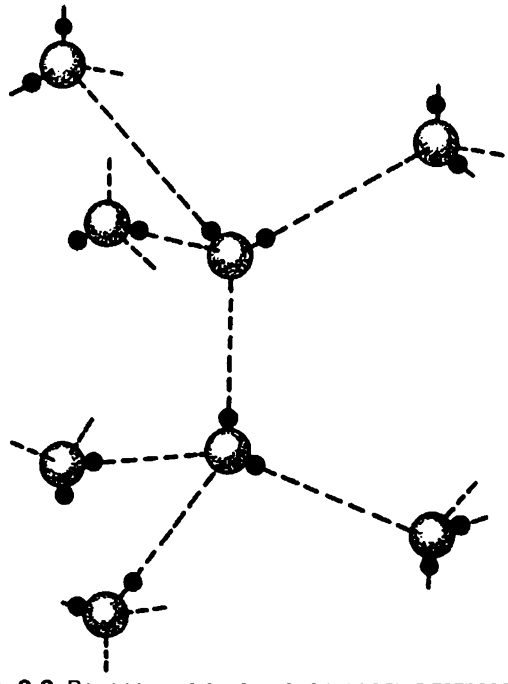


Рис. 2.2. Водородные связи молекул воды в тетраэдрической конфигурации. Более крупными сферами представлены атомы кислорода, а черными точками — атомы водорода. Водородные связи обозначены пунктирными линиями

Поскольку каждая молекула воды имеет одинаковое количество донорских и акцепторных участков водородных связей, расположение которых разрешает трехмерное водородное связывание, силы притяжения между молекулами воды оказываются необычно большими, даже по сравнению с силами, которые существуют между другими небольшими молекулами, также участвующими в ассоциациях на основе водородных связей (например, NH_3, HF). Так как у аммиака (с его тетраэдрическим расположением трех донорских и одного акцепторного участков) и фтористого водорода (с его тетраэдрическим расположением одного донорского и трех акцепторных участков) нет равного количества донорских и акцепторных участков, они не могут образовать трехмерные сети на основе водородных связей того же типа, что у воды. Оба эти вещества ограничиваются формированием экстенсивных двухмерных сетей с меньшим числом водородных связей на молекулу, чем в случае воды.

Осмыслить ассоциации нескольких молекул воды становится значительно сложнее, если принять во внимание изотопные варианты, ионы гидроксилов и гидроксония. Ион гидроксония с его положительным зарядом обладает бо́льшим потенциалом донора водородной связи, чем неионизированная вода (рис. 2.3, *a*), а гидроксильный ион благодаря своему отрицательному заряду обладает бо́льшим потенциалом акцептора водородной связи, чем неионизированная вода (рис. 2.3, *b*).

Такая способность воды участвовать в экстенсивном трехмерном водородном связывании позволяет логически объяснить многие ее необычные свойства, в частности наблюдаемые большие значения теплоемкости, температуры плавления, точки кипения, поверхностного натяжения и энтальпии фазового перехода. Все эти случаи могут быть связаны с дополнительной энергией, необходимой для разрыва большого количества межмолекулярных водородных связей.

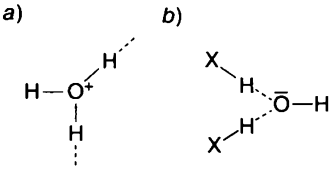


Рис. 2.3. Структура и возможности водородной связи: *a* — для иона гидроксония; *b* для гидроксильного иона. Пунктиром обозначены водородные связи, а X—H представляет молекулу растворенного вещества или другую молекулу воды

Водородные связи влияют также на диэлектрическую проницаемость (диэлектрическую постоянную) воды. Хотя вода — это диполь, одно это свой-

ство не объясняет ее большую диэлектрическую проницаемость. По-видимому, водородно-связанные молекулярные кластеры порождают многомолекулярные диполи, значительно увеличивая диэлектрическую проницаемость.

2.5. Диссоциация молекул воды

Как мы уже отмечали, двумя элементами чистой воды являются ионы, образующиеся в результате самодиссоциации молекулы. В своей простейшей форме их разделяют на водородный ион (H^+) и гидроксильный ион (OH^-), хотя в действительности они существуют в гидратированной форме. В чистой воде они присутствуют в эквимолярных количествах, поскольку образуются в процессе самодиссоциации:

$$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-.$$

При температуре 298 K константа равновесия для этой диссоциации $K_w = 10^{-14}$, а значение pH равно 7. Важно иметь в виду, что при более высоких температурах эта диссоциация усиливается, и потому значение pH чистой воды зависит от температуры. При 373 K константа равновесия K_w приближается к 10^{-12}, и при этой температуре значение pH становится близким к 6. Следует отметить, что значение pH, равное 6 при 298 K, предполагает концентрацию ионов OH^-, близкую к 10^{-8} M, а при 373 K pH 6 предполагает концентрацию OH^- около 10^{-6} M.

2.6. Структуры систем чистой воды

2.6.1. Структура льда

Перед рассмотрением структуры жидкой воды мы обсудим структуру льда, поскольку его структура более понятна и является логическим продолжением представленной выше информации. Вода с ее тетраэдрально направленными силами кристаллизуется в виде открытой структуры низкой плотности. Межъядерное расстояние между ближайшими соседними атомами кислорода O—O для льда составляет 2,76 Å, а угол связи O—O—O — около 109°, что очень близко к совершенному тетраэдрическому углу 109,28° (рис. 2.4). Способ соединения каждой HOH-связи с четырьмя другими (координационное число 4) наглядно показан для элементарной ячейки льда на рис. 2.4 при рассмотрении молекулы воды (*W*) и ее четырех ближайших соседей (1, 2, 3 и *W'*).

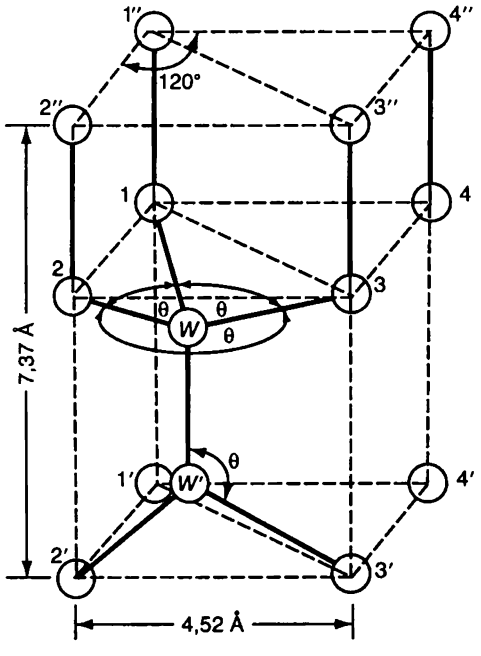


Рис. 2.4. Элементарная ячейка обычного льда при 0 °C. Окружности соответствуют атомам кислорода молекул воды. Межъядерное расстояние между ближайшими атомами кислорода (O—O) составляет 2,76 Å. Угол θ = 109°

При объединении нескольких элементарных ячеек и рассмотрении их сверху (вниз по *c*—оси), обнаруживается гексагональная симметрия льда (рис. 2.5). Очевидна тетраэдрическая подструктура с молекулой *W* и ее четырьмя ближайшими соседями, из которых видимы молекулы 1, 2 и 3, а четвертая располагается ниже в плоскости листа бумаги, прямо под молекулой *W*. При рассмотрении рис. 2.5, *a* в трех измерениях (как на рис. 2.5, *b*) очевидно участие двух плоскостей молекул (белые и черные кружки). Эти две плоскости параллельны, расположены очень близко друг к другу и при «скольжении» или течении льда под давлением (например, в леднике) движутся как единое целое. Пары плоскостей этого типа образуют базисные плоскости льда. При укладке несколько базисных плоскостей получается расширенная структура льда. Чтобы образовать структуру, представленную на рис. 2.6, были объединены три базисные плоскости. При рассмотрении вниз вдоль *c*-оси эта структура выглядит точно так же, как и на рис. 2.5, *a*, что свидетельствует о том, что базисные плоскости ориентированы

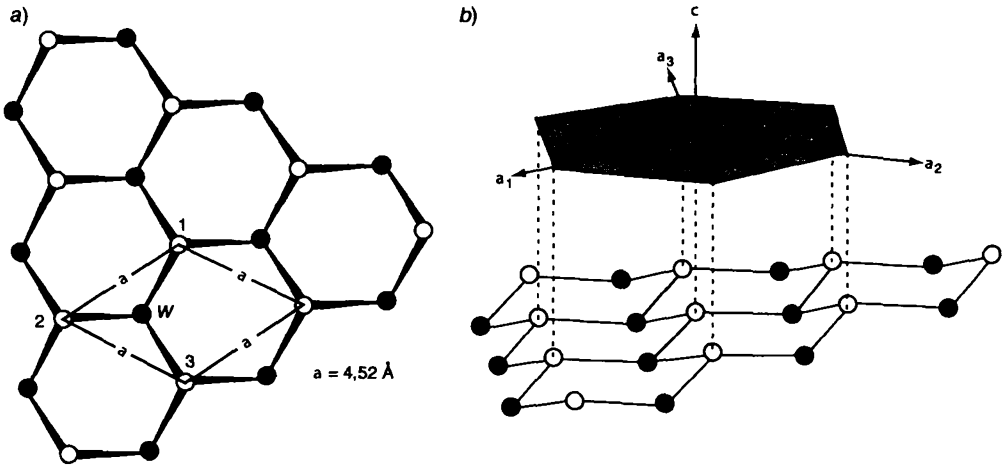


Рис. 2.5. Базисная плоскость льда (сочетание двух слоев с незначительно различающимся возвышением). Каждый кружок соответствует атому кислорода молекулы воды. Белые и черные кружки соответствуют атомам кислорода (соответственно в верхнем и нижнем слое базисной плоскости): *a* — гексагональная структура, видимая при рассмотрении сверху вниз вдоль с-оси. Пронумерованные атомы относятся к элементарной ячейке, представленной на рис. 2.4; *b* — трехмерная структура базисной плоскости. Передний край этого вида соответствует нижнему краю вида (*a*). Кристаллографические оси расположены в соответствии с внешней точечной симметрией

совершенно одинаково. Лед в этом направлении является монопреломляющим, а во всех других направлениях двоякопреломляющим, и поэтому *c*-ось — оптическая ось льда. Интересно, что в больших листах льда *c*-ось зачастую располагается перпендикулярно к основной плоскости листа [5]. Полностью удовлетворительного объяснения для этого факта еще не предложено, хотя он может свидетельствовать о различных скоростях распространения роста льда вдоль разных осей симметрии.

О расположении атомов водорода в молекуле льда принято следующее общее соглашение.

- Каждая линия, соединяющая два ближайших соседних атома кислорода, занимается одним атомом водорода, центр которого находится на расстоянии 1 ± 0,01 Å от атома кислорода, с которым он ковалентно связан, и на расстоянии 1,76 ± 0,01 Å от атома кислорода в случае водородной связи. Эта конфигурация приведена на рис. 2.7, *a*.

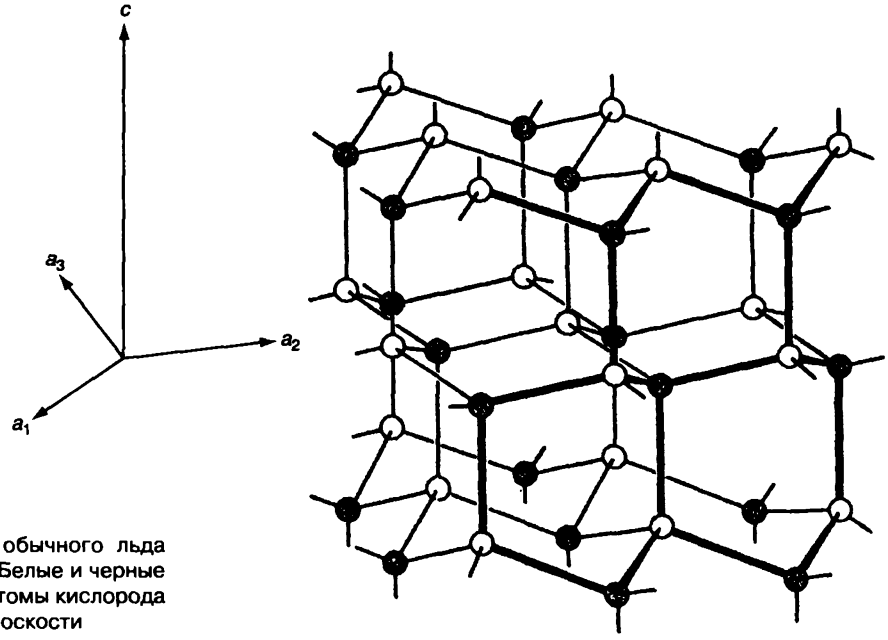


Рис. 2.6. Расширенная структура обычного льда (показаны только атомы кислорода). Белые и черные кружки обозначают соответственно атомы кислорода в верхнем и нижнем слое базисной плоскости

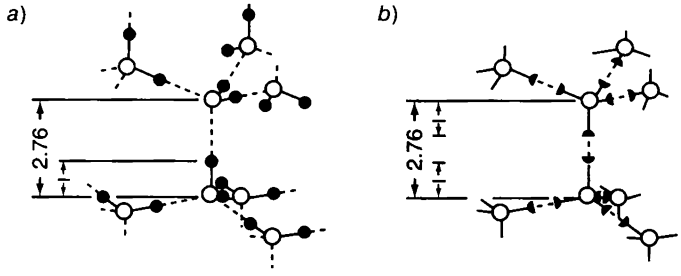


Рис. 2.7. Расположение атомов водорода (•) в структуре льда: *a* — мгновенная структура; *b* — усредненная структура (называемая также структурой половинного водорода (◖), структурой Полинга или среднестатистической структурой). Светлыми кружками обозначены атомы кислорода

Если же расположение атомов водорода рассматривать во времени, а не как моментальный «снимок», то получается картина, несколько отличающаяся от вышеописанной. Атом водорода на линии, соединяющей два ближайших соседних атома кислорода *X* и *Y*, может находиться в одном из двух возможных положений: или на расстоянии 1 Å от *X*, или на расстоянии 1 Å от *Y*. Так как эти два положения могут быть заняты с равной вероятностью, то считается, что в среднем каждое положение занято половину времени. Это возможно вследствие того, что за исключением чрезвычайно низких температур молекулы HOH могут совместно вращаться, и вследствие этого они дают возможность атомам водорода «перескакивать» между соседними атомами кислорода. Получающаяся усредненная структура известна под разными названиями — «структура половинного водорода», структура Полинга или среднестатистическая структура. Она представлена на рис. 2.7, *b*.

С точки зрения кристаллографической симметрии обыкновенный лед относится к дигексагональному бипирамидальному классу гексагональной системы. Лед также может существовать в девяти других кристаллических полиморфных структурах, а также в аморфном или стекловидном состоянии неопределенной, в значительной степени некристаллической структуры. Из всех 11 структур только обыкновенный гексагональный лед стабилен при нормальном давлении при 0 °C.

Истинная структура льда не столь проста, как может показаться из предшествующего материала. Чистый лед содержит не только обычные молекулы HOH, но и их изотопные и ионные варианты, которые мы уже упоминали как микроэлементы воды. Во многих случаях структурное влияние изотопных вариантов можно игнорировать, поскольку они присутствуют в очень малых количествах, и основное внимание следует уделять только роли HOH, H^+ (H_3O^+) и OH^-

Реальные кристаллы льда никогда не бывают совершенными, и встречающиеся структурные дефекты имеют обычно ориентационный тип (вызываемый дислокацией протона, сопровождающейся нейтрализующей ориентационной корректировкой) или ионный тип (вызываемый дислокацией протона с образованием H_3O^+ и OH^-) (рис. 2.8). Наличие таких структурных дефектов позволяет объяснить неожиданно высокую подвижность протонов во льду, а также относительно небольшое уменьшение удельной электропроводности при замерзании воды, поскольку интуитивно можно было бы ожидать большую потерю электропроводности после замерзания.

Помимо причастности подвижности атомов к дефектам кристаллов (кристаллической решетки) льда существуют и другие типы подвижности. Считается, что при температуре −10 °C каждая молекула HOH

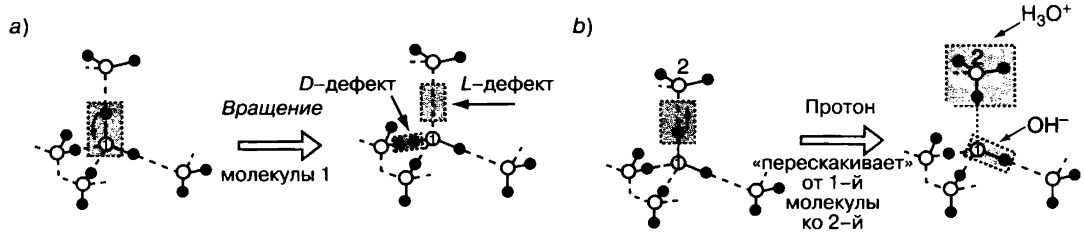


Рис. 2.8. Схематическое представление протонных дефектов льда: *a* — образование ориентационных дефектов; *b* — образование ионных дефектов. Светлыми и черными кружками обозначены соответственно атомы кислорода и водорода, а сплошными и пунктирными линиями — соотвественно химические и водородные связи

льда вибрирует со среднеквадратической амплитудой колебаний (исходя из предположения, что каждая молекула колеблется как единое целое) около 0,4 Å [5]. Кроме того, отдельные молекулы HOH, которые предположительно занимают некоторые поровые пространства льда, могут медленно диффундировать через кристаллическую решетку, а не оставаться в конкретном поровом пространстве. Из-за этого лед — это далеко не статическая или гомогенная совокупность молекул, и его характеристики зависят от температуры. Хотя координационное число для молекул воды в состоянии льда при всех температурах равно 4, чтобы ограничить атомы водорода только одной из многих возможных конфигураций необходимо понизить температуру примерно до −180 °C и ниже. Следовательно, только лишь при температурах около −180 °C и ниже все водородные связи будут оставаться неповрежденным, и с повышением температуры среднее число неповрежденных (фиксированных) водородных связей будет постепенно снижаться.

2.6.2. Структура воды в жидком состоянии

На первый взгляд для жидкости понятие структуры может казаться странным, так как сущностным свойством жидкого состояния является текучесть. Вместе с тем согласно повсеместно принятой идее [6] жидкая вода обладает некоторым уровнем структуры, не достаточно установившейся для создания дальнодействующей жесткости, но значительно более организованной по сравнению с уровнем структуры в парообразном состоянии. Такая степень структурированности достаточна, чтобы ориентация и подвижность любой данной молекулы воды находились под влиянием соседних молекул. Полезно воспринимать структуру жидкости как ряд кратковременных и быстро взаимозаменяемых структурных ассоциаций, все время сохраняющих среднюю степень структурированности.

Данные для такого понимания воды как структурированной жидкости обширны и убедительны. Например, вода — это «открытая» жидкость, плотность которой составляет лишь 60% от плотности, ожидаемой для жидкости с плотно упакованными молекулами. Такая низкая плотность жидкой воды легко объясняется частичным сохранением открытой тетраэдрической структуры льда, основанной на водородных связях. Более того, хотя энтальпия плавления льда необычно высока для твердого вещества, она соответствует энергии, которая необходима для разрыва около 15% существующих во льду водородных связей. Это необязательно подразумевает, что остальные 85% водородных связей льда сохраняются в жидкой воде (например, связей может быть разорвано больше, но результирующее изменение энергии может маскироваться одновременным увеличением Ван-дер-Ваальсовских взаимодействий). Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что многие водородные связи «вода—вода» в жидкости продолжают существовать, хотя степень водородного связывания с увеличением температуры жидкости уменьшается [1, 7].

Объяснение структуры (структур) чистой жидкой воды — проблема чрезвычайно сложная и стимулирующая научные исследования. Предложено много теорий, но все они являются неполными, упрощенными и имеют свои слабости, быстро замечаемые сторонниками конкурирующих теорий. Это здоровая ситуация должна, в конечном счете, привести к точному структурному описанию жидкой воды. В последние годы с увеличением мощности компьютеров удалось создать компьютерные модели молекулярной динамики воды, подчиняющейся уравнениям движения, и потенциальных молекулярных функций, позволяющих аппроксимировать важные интерактивные состояния молекулы воды [8–10]. Эти имитационные модели, ограниченные по своей природе погрешностями и аппроксимациями выбранной потенциальной функции, демонстрируют многие характерные свойства жидкой воды и предоставляют новые возможности для понимания ее сущности. Визуализация движения молекул с помощью имитационного моделирования очень поучительна, но его трудно зафиксировать на бумаге. Несмотря на все возрастающую сложность этих имитационных моделей и их ценность для понимания сути проблемы, полезно рассмотреть предшествующие модели, разработанные еще до появления мощных компьютеров.

Для жидкой воды были предложены три общих типа моделей молекулярной динамики воды: модели смеси, модели пор и континуум-модели (называемые также гомогенными) [11, 12]. В моделях смеси реализована концепция межмолекулярных водородных связей, «на мгновение» сосредоточенных в больших кластерах молекул воды, которые существуют в динамическом равновесии с более плотными видами молекул (при этом понятие «на мгновение» соответствует масштабу времени примерно 10^{-11} с) [12]. Динамические компьютерные имитационные молекулярные модели зачастую представляют собой вариант реализации этого типа подхода, где имитация предоставляет последовательность во времени моментальных

снимков положения (а зачастую и ориентации) молекул, представленных в модели. Точные ее характеристики зависят от приписываемой воде потенциальной функции взаимодействия, причем было предложено и использовалось много различных потенциальных функций, каждая со своими особыми преимуществами и недостатками.

В континуум-моделях использована идея о том, что межмолекулярные водородные связи распределены в образце единообразно, и что многие существующие во льду связи не разрываются при таянии льда, а просто деформируются. Предполагается, что это позволяет существовать непрерывной сети молекул воды, динамической по своей природе, причем с деформациями, способными перемещаться в пространстве путем их переноса по сети [13, 14].

Модель пор основана на концепции воды, сохраняющей с незначительным искажением (ледового или клатратного типа) сетевую структуру на основе водородных связей с отдельными несвязанными молекулами воды, заполняющими поровые пространства (междоузлие) сети. Во всех трех моделях доминирующей структурной особенностью является концепция ассоциации жидкой воды на основе водородных связей в кратковременных деформированных тетраэдрах. Все указанные модели также разрешают отдельным молекулам воды часто изменять свои связи путем быстрой замены одной водородной связи на новую, при этом сохраняя (при стабильной температуре) постоянную степень водородного связывания и структуры для системы в целом.

Во многих отношениях новейшие компьютерные модели молекулярной динамики воды демонстрируют свойства более традиционных моделей [10]. Имеются данные об изменении ориентации водородных связей и перемещении молекул воды в положения, не поддерживаемые традиционной сетью с водородными связями. Различные модельные исследования успешно аппроксимируют наблюдаемое поведение воды. В компьютерных моделях, дающих усредненную по времени картину, несмотря на несомненную важность водородного связывания, не образуются четко определенные структуры, предполагаемые более простыми моделями.

После этого небольшого экскурса в историю моделирования можно перейти к рассмотрению кажущейся аномально низкой вязкости воды. Этот показатель легко совместим с описанными типами структур, поскольку расположения молекул воды с водородными связями очень динамичны и позволяют отдельным молекулам за короткие интервалы времени (от нано- до пикосекунд) менять свои взаимоотношения с соседними молекулами, основанные на водородных связях, повышая тем самым подвижность и текучесть. Необычно высокая теплоемкость жидкой воды является частичным отражением энергии, требуемой при повышении температуры для разрыва дополнительных водородных связей. Высокая энтальпия парообразования отражает разрыв большинства или всех оставшихся водородных связей при испарении жидкости, так как большинство молекул пара считаются мономерами.

Степень межмолекулярного водородного связывания между молекулами воды зависит от температуры. Для льда при 0 °С координационное число (количество ближайших молекул-соседей) равно 4,0 при расстоянии между ближайшими соседями 2,76 Å. С достижением энтальпии плавления происходит таяние. Энтальпия плавления отражает разрушение некоторых водородных связей (при этом расстояние между ближайшими молекулами-соседями увеличивается) и деформацию других водородных связей по мере того, как молекулы воды принимают жидкое состояние вместе с более компактными в среднем ассоциациями. С повышением температуры координационное число увеличивается с 4,0 (для льда при температуре 0 °С) до 4,4 (для воды с температурой 1,50 °С) и затем — до 4,9 при температуре 83 °С. Одновременно расстояние между ближайшими молекулами-соседями увеличивается с 2,76 Å для льда при 0 °С до 2,9 Å для воды при 1,50 °С, а затем до 3,05 Å при температуре 83 °С [15, 16].

Очевидно, что превращение льда в воду сопровождается увеличением расстояния между ближайшими молекулами-соседями (из-за чего уменьшается плотность) и увеличением среднего количества ближайших соседей (из-за чего плотность увеличивается) с превалированием последнего в ходе фазового перехода, что приводит к известному чистому увеличению плотности при таянии льда. При дальнейшем нагревании воды выше температуры плавления плотность достигает максимума при температуре 3,98 °С, а затем постепенно снижается. Очевидно, что эффект от увеличения координационного числа превалирует при температурах от 0 до 3,98 °С, а эффект от увеличения расстояния между ближайшими молекулами-соседями (тепловое расширение) превалирует при температурах выше 3,98 °С.

2.7. Фазовые соотношения чистой воды

Выше мы рассмотрели только молекулярные и структурные аспекты воды — другими словами, взаимодействия и взаимосвязи на микроскопическом и субмикроскопическом уровнях.

Теперь же мы перейдем к рассмотрению наблюдаемого фазового поведения воды, поскольку это важно не только для нашей оценки свойств чистой воды, но и для последующего обсуждения поведения водных растворов в широком диапазоне значений температуры и давления. При изучении фазовых соотношений чистой воды необходимо учитывать влияние как температуры, так и давления.

Фазовая диаграмма для чистой воды приведена на рис. 2.9, *a*. Особую важность для пищевой химии имеют линия равновесия «пар–жидкость», а также зависимость стабильных форм льда от давления. Как мы уже отмечали, идентифицировано несколько форм льда, каждая из которых стабильна в определенной области диаграммы «температура–давление». При температурах и давлениях, используемых в производстве пищевых продуктов, интерес представляет единственная фаза льда — лед I. Примечательно, что для льда I с увеличением давления температура плавления льда I*h* снижается (рис. 2.9, *b*). Следует особо отметить, что при давлении 270 МПа температура плавления льда I*h* ниже –20 °С. Этот факт находит применение в методе замораживания с быстрым сбросом давления [17, 18], при котором пищевой продукт охлаждается до –20 °С под высоким давлением. В этих условиях материал находится выше точки замерзания льда, и вода остается жидкой, хотя энтальпия (теплосодержание) уменьшается. При сбросе давления происходит очень быстрое замораживание материала, поскольку стабильной формой воды в новых условиях температуры и давления является лед; при этом теплосодержание (энтальпия) образца не изменяется, так как имеющееся теплосодержание уже соответствует состоянию льда (в условиях нормальной температуры и давления). В обратном процессе размораживания (оттаивания) замороженный материал подвергают достаточно высокому давлению, чтобы дать возможность воде перейти в стабильную фазу без изменения температуры. Так как давление может быть приложено почти мгновенно, то и размораживание происходит сразу же. После повышения температуры выше 0 °С приложенное давление может быть сброшено без образования льда. Таким образом, происходит процесс размораживания, при котором фазовое превращение в материале происходит единообразно во всем пространстве материала, а не по мере поступательного перемещения фронта, которое отражает геометрическую конфигурацию изменения температуры при процессах теплообмена. При давлениях выше значений, при которых лед I является стабильной фазой, существуют другие формы льда (лед II, лед III, лед IV и т. д.), которые не встречаются в условиях производства, транспортировки и хранения пищевых продуктов, и поэтому мы здесь их рассматривать не будем.

При рассмотрении равновесных состояний в системах «пар–жидкость» можно отметить, что давление пара чистой жидкой воды возрастает с 610 Па при температуре 0 °С до 101 323 Па при температуре 100 °С. Также можно измерить давление водяного пара над переохлажденной жидкой водой при температурах ниже 0 °С, то есть в условиях, в которых равновесной формой HOH является лед. Эти давления всегда выше, чем равновесное давление пара воды надо льдом при той же температуре (табл. 2.3). Важность этих результатов наблюдений для пищевой химии, особенно имея в виду использование относительного давления пара в качестве индикатора «доступности воды», мы рассмотрим далее. Поскольку вода является важным компонентом пищевых продуктов, необходимо разработать некоторую систему (системы) для описания количества и состояния воды в пищевом продукте, но чтобы понять влияние молекулярной окружающей среды на свойства воды на молекулярном и макроскопическом (объемном) уровнях, перед определением подходящего дескриптора (индикатора) сначала следует рассмотреть системы более сложные, чем чистая вода.

2.8. Вода с растворенными в ней веществами

Во всех пищевых системах присутствуют вода и растворенные в ней вещества, что требует рассмотрения влияния растворенных веществ на природу и поведение совокупности молекул воды, включая ее свойства как растворителя.

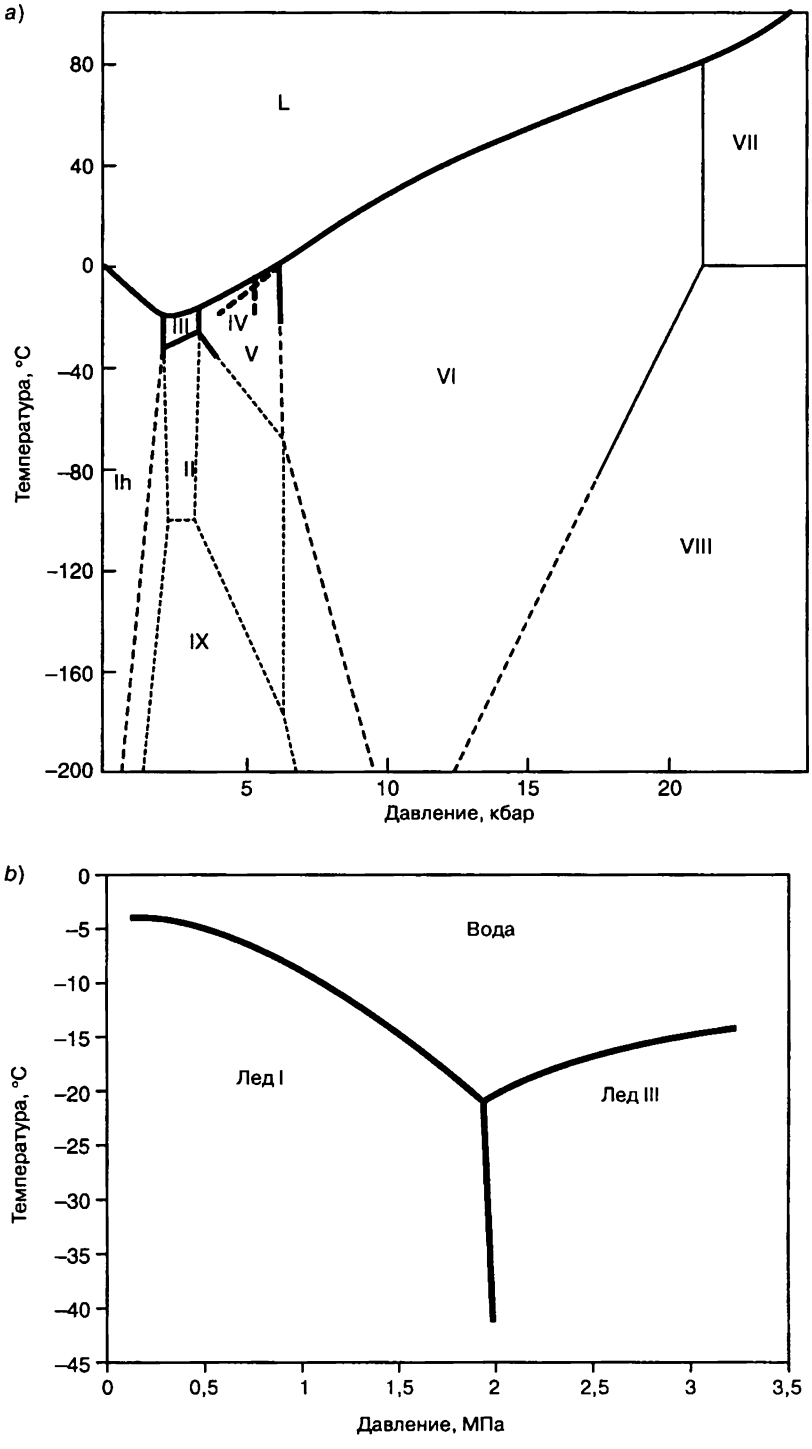


Рис. 2.9. *a* — фазовая диаграмма «давление–температура» для чистой воды; *b* — особенности поведения жидкой воды, льда I и III

Таблица 2.3
Давление пара и отношение давлений водяного пара и льда. По [110, 111]

Температура, °С	$(p°)_w$ воды, кПа	$(p°)_i$ льда, кПа	$(p°)/(p°)_w$
100	101,325		
90	70,123		
80	47,379		
70	31,181		
60	19,936		
50	12,346		
40	7,382		
30	4,245		
20	2,338		
10	1,228		
0	0,611	0,611	1,00
−5	0,42l[a]	0,402	0,954
−10	(),287[a]	0,260	0,905
−15	0,191[a]	0,165	0,863
−20	0,125[a,b]	0,103	0,824
−25	0,0807[a,b]	0,063	0,780
−30	0,0509[a,b]	0,038	0,746
−40	0,0189[a,b]	0,013	0,687
−50	0,0064[a,b]	0,039	0,609

[a] Переохлажденная жидкость.
[b] Расчетные данные.

2.8.1. Лед с присутствующими в нем растворенными веществами

Присутствие растворенных веществ влияет как на количество (через термодинамические эффекты) льда в водной системе, так и на его характер распространения (через кинетические эффекты). С увеличением концентрации растворенного вещества количество образующегося льда уменьшается, что является проявлением снижения температуры замерзания и коллигативных эффектов. Из простой фазовой диаграммы для бинарной водной системы (рис. 2.10) можно видеть, как меняется температура замерзания бинарного водного раствора в зависимости от концентрации. Подробнее фазовую диаграмму и диаграмму состояний мы рассмотрим далее.

Количество и тип присутствующих в воде растворенных веществ влияют не только на количество, но и на размер, структуру, расположение и ориентацию кристаллов льда, образующихся при любом конкретном режиме охлаждения. Рассмотрим, например, влияние растворенного вещества на структуру льда. В работах [19–21] изучался внешний вид кристаллов льда, образующихся при различных условиях замораживания в присутствии разных растворенных веществ, в том числе сахарозы, глицерина, желатина, альбумина и миозина. В результате была разработана система классификации, основанная на морфологии и элементах симметрии различных типов видимых структур льда, а также на скорости охлаждения, требуемой для их формирования. К четырем основным классификационным группам видимых структур льда были отнесены гексагональные формы, нерегулярные дендриты, крупнозернистые и недолговечные сферолиты.

Наиболее упорядоченная гексагональная форма обнаруживается в пищевых продуктах исключительно при условии, что не используются режимы ускоренного замораживания, а тип и концентрация растворенных веществ не оказывает чрезмерного воздействия на подвижность (легкость пространственной реорганизации) молекул воды. Так, желатин в высокой концентрации приводит к образованию менее упорядоченных форм кристаллов льда. В этих ранних работах было получено явное доказательство существования стекловидной (аморфной) незамороженной фазы, окружающей кристаллы льда при низких температурах,

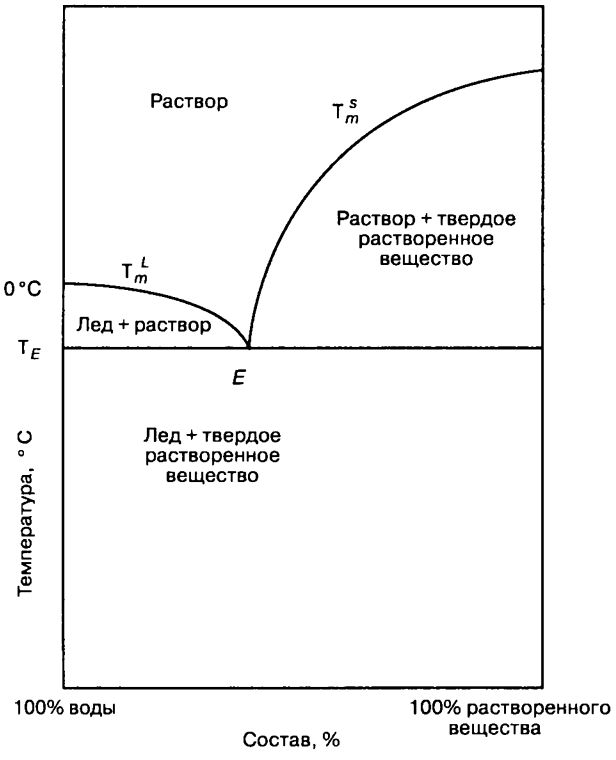


Рис. 2.10. Схематическое представление бинарной фазовой диаграммы для простой водной системы

и наличие этой фазы было связано с такими явлениями, как «коллапс» при сублимационной сушке. Примерно в то же время проводились работы [22, 23] по исследованию свойств фаз, вовлеченных в процесс сублимационной сушки, и были получены сходные результаты. Хотя значимость этих исследований не была сразу полностью осознана, эти работы послужили предшественниками для разработки теорий о роли стеклообразного состояния для кинетических свойств замороженных систем. Подробно эти важные концепции мы рассмотрим далее.

2.8.2. Взаимодействия «вода – растворенное вещество» в водных растворах

2.8.2.1. Макроскопический уровень

Перед описанием взаимодействий «вода–растворенное вещество» на молекулярном уровне уместно привести некоторые общие сведения о поведении воды. Присутствие воды оказывает значительное влияние на свойства пищевых продуктов, которые меняются при изменении содержания влаги. Для облегчения описания влияния воды на свойства пищевых систем предложены такие термины, как влагосвязывающая способность (ВСС), гидратация и влагоудерживающая способность (ВУС) [24, 25]. Эти понятия, зачастую основанные на макроскопических наблюдениях, могут оказаться неудачными при рассмотрении основополагающих молекулярных процессов, которые они предположительно отражают. Тем не менее, эти описательные понятия можно использовать, поскольку они сыграли важную роль в развитии нашего понимания свойств и влияния воды в пищевых продуктах.

В прошлом понятия «связывание воды» и «гидратация» зачастую использовались для описания общей тенденции связывания воды с гидрофильными веществами, в том числе клеточными материалами. Эти понятия при использовании в таком контексте относятся к макроскопическому уровню. Несмотря на то что более специализированные термины, например, «влагосвязывающая способность», определяется количественно, они применяются только на макроскопическом уровне. Степень и прочность связывания воды или гидратации зависят от ряда факторов, в том числе от типа неводного компонента, солевого состава, значений pH и температуры.

Понятие «влагоудерживающая способность» зачастую используется для описания способности молекулярного матрикса, (обычно присутствующих в низкой концентрации макромолекул) физически захватывать большие количества воды так, что это препятствует экссудации при воздействии внешних (часто гравитационных) сил. Известными пищевыми матриксами, удерживающими влагу таким способом, являются пектиновые и крахмальные гели, а также клетки растительных и животных тканей.

Физически захваченная вода с трудом вытекает из тканевых продуктов даже при резке или измельчении, однако свойства этой воды в ходе обработки близки к свойствам чистой воды. Она легко удаляется при сушке, легко превращается в лед при замораживании и легкодоступна как растворитель. Таким образом, несмотря на сильную ограниченность ее объемной текучести движение отдельных молекул по существу сходно с движением молекул воды в разбавленном солевом растворе.

Большая часть воды в тканях и гелях может характеризоваться как физически захваченная (удерживаемая), и ослабление этой влагоудерживающей способности пищевых продуктов оказывает сильное воздействие на их качество. Примерами дефектов качества, связанных с ослаблением ВУС, могут служить

синерезис гелей, экссудация при размораживании замороженных продуктов и пониженная эффективность животных тканей в колбасных изделиях вследствие снижения значения pH мышечной ткани при нормальных физиологических процессах *post mortem*. Во всех случаях эти дефекты качества обусловлены физическим перемещением молекул воды в пространстве, но необязательно отражают какие-либо существенные изменения во взаимодействии этих молекул между собой.

2.8.2.2. Молекулярный уровень. Общие соображения

Тщательное перемешивание растворенных веществ и воды приводит к изменению свойств обоих компонентов по сравнению с их свойствами в несмешанном состоянии. Эти изменения являются результатом межмолекулярных взаимодействий, и зависят поэтому от поведения растворенного вещества на молекулярном уровне. Ионы или заряженные группы взаимодействуют с водой в основном благодаря электростатическим силам. Они могут улучшать или по иному влиять на нормальную геометрическую ориентацию молекул воды. Гидрофильные растворенные вещества легко взаимодействуют с водой и вызывают изменения в структурных ассоциациях и подвижности соседних молекул воды, а вода изменяет реакционную способность, а иногда и структуру гидрофильных растворенных веществ. Напротив, гидрофобные группы добавленных растворенных веществ слабо взаимодействуют с соседними молекулами воды, словно они предпочитают неводную окружающую среду. Вместе с тем у этих слабых взаимодействий могут быть глубокие структурные последствия. Силы сцепления между водой и различными типами растворенных веществ приведены в табл. 2.4.

Таблица 2.4
Классификации типов взаимодействий «вода–растворенное вещество»

Тип взаимодействия	Пример	Энергия связи	Примечания
Вода–вода	Водородная связь	5–25 кДж/моль	
Диполь–ион	Негидратированный ион	40–600 кДж	Зависит от размера иона и его заряда
	Замещение воды поляряными группами органических молекул		Зависит от значения pH и ионной силы
Диполь–диполь	Вода– NH–группа белка	5–25 кДж/моль	
	Вода–CO–группа белка	5–25 кДж/моль	
	Вода–OH–группа боковой цепи	5–25 кДж/моль	
Гидрофобная гидратация	Вода + R → R(гидр.)	Слабая	Кумулятивная сумма больше
Гидрофобное взаимодействие	2R(гидр.) → R_2(гидр.) + H_2O	То же	То же

2.8.2.3. Молекулярный уровень. «Связанная вода»

Обычно понятие «связанной воды» определить довольно трудно — оно не относится к гомогенному объекту и даже необязательно относится в воде, находящейся в некоторой форме ассоциации с растворенным веществом. Унифицированной, логически последовательной дескриптивной терминологии для связанной воды добиться весьма трудно, и как свидетельствуют многочисленные и зачастую противоречивые определения, среди ученых нет согласия в том, какое определение связанной воды является наилучшим. Этот спорный и зачастую плохо понимаемый термин зачастую используется неправильно, и многие специалисты предлагают вообще отказаться от дальнейшего его использования, поскольку такой шаг желателен в интересах более точного представления информации. Вместе с тем понятие и термин «связанная вода» встречается так часто, что необходимо особо рассмотреть и оценить его ограничения.

Ниже мы приводим неполный список определений, предложенных для связанной воды, из которого можно понять, почему его использование привело к путанице [24, 25]. Связанная вода — это:

равновесное содержание влаги в образце при некоторой произвольной температуре и низкой относительной влажности;

вода, которая не оказывает существенного влияния на диэлектрическую проницаемость на высоких частотах и поэтому ее вращательная подвижность ограничена связанным с ней веществом;

вода, которая остается незамороженной при некоторой произвольно низкой температуре (обычно –40 °С и ниже);

вода, которая недоступна как растворитель для дополнительных растворенных веществ;

- вода, которая вызывает уширение линий в экспериментах с использованием протонного ЯМР;

вода, которая перемещается с макромолекулой в экспериментах по скорости седиментации, вязкости или диффузии;

вода, присутствующая вблизи растворенных и других неводных веществ и имеющая видимые свойства, значительно отличающиеся от свойств «объемной» воды в той же системе.

Все эти определения в тех или иных условиях обоснованы, но немногие из них позволяют получить одинаковое значение при использовании в одной и той же заданной системе. Кроме того, в некоторых случаях значение, полученное для связанной воды с использованием конкретного метода и определения, зависит от общего содержания влаги в системе, даже если оно уже превышает количество определяемой связанной воды.

С концептуальной точки зрения полезно воспринимать связанную воду как термин, который каким-то, пусть и несовершенным, образом описывает «воду, присутствующую вблизи растворенных веществ и других неводных компонентов и которая благодаря ее локализации проявляет видимые свойства, существенно отличающиеся от свойств объемной воды в той же системе». Связанную воду можно понимать не как «неподвижную», а как имеющую каким-то образом «заторможенную подвижность» по сравнению с объемной водой. В типичном пищевом продукте с высоким содержанием влаги к этому типу воды относится лишь малая доля всей присутствующей воды, приблизительно соответствующая первому слою молекул воды в пространстве вблизи гидрофильных групп. Тем не менее, следует иметь в виду, что связанная вода — это не статическая совокупность молекул воды.

Тему связанной или «заторможенной» воды рассмотрим далее в разделе, посвященном подвижности молекул в замороженных пищевых системах.

2.8.2.4. Взаимодействия воды с ионами и ионными группами

Отдельные ионы, а также ионные группы органических молекул, по-видимому, затрудняют или влияют на подвижность молекул воды в большей степени, чем любые другие типы растворенных веществ. Сила электростатических связей «вода–ион» больше силы водородных связей «вода–вода», но значительно меньше силы ковалентных связей.

Общепринятая нормальная структура чистой воды (обычно тетраэдрическое расположение, основанное на водородных связях) может быть разрушена добавлением диссоциирующихся растворенных веществ. Вода и простые неорганические ионы подвергаются дипольно-ионным взаимодействиям. Пример, приведенный на рис. 2.11, иллюстрирует гидратацию ионной пары NaCl. На нем изображены только молекулы воды первого слоя в плоскости бумаги, ориентированные по связанным с ионами радиальным электрическим полям. Считается, что в разбавленном растворе ионов в воде второй слой молекул воды вне этого первого слоя существует в структурно возмущенном состоянии вследствие конфликтующих структурных воздействий воды первого слоя, окружающей заряженные ионы, и более удаленной, тетраэдрально ориентированной воды «объемной фазы», которая изолирована от влияния окружающих ионы радиальных электрических полей. В концентрированных солевых растворах, где электрические поля отдельных ионов перекрываются, воды объемной фазы нет, и структура воды будет в основном определяться ионами.

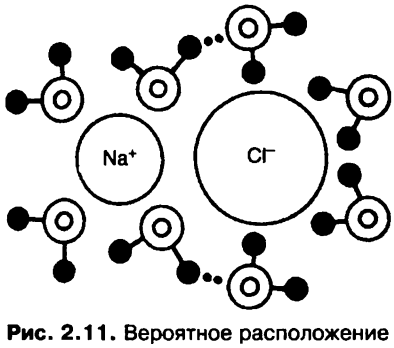


Рис. 2.11. Вероятное расположение молекул воды вблизи ионной пары хлорида натрия. Представлены только молекулы воды в плоскости бумаги

Существуют многочисленные свидетельства того, что некоторые ионы в разбавленном водном растворе обладают эффектом «разрушения сетевой структуры» (раствор становится более текучим, чем чистая вода), тогда как другие обладают эффектом «формирования сетевой структуры» (раствор становится менее текучим). Данное явле-

ние не означает, что эта «структура» соответствует структуре, существующей в чистой воде. Термин «сетевая структура» относится ко всем видам структур, будь то нормальная структура воды или новые типы ее структуры. С точки зрения «нормальной» структуры воды, конечно, все ионы являются деструктивными, так как у нормальной структуры воды нет радиальной симметрии [26].

Способность данного иона изменять сетевую структуру тесно связана с его поляризующей мощностью (заряд, деленный на радиус) или просто с силой его электрического поля. Небольшие и/или многовалентные ионы (например, Li^+, Na^+, H_3O^+, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, F^- и OH^-) имеют сильные электрические поля и являются промоторами сетевой структуры. Структура, налагаемая этими ионами, с избытком компенсирует любые потери в нормальной структуре воды. Эти ионы взаимодействуют с 4–6 молекулами воды первого слоя, делая их менее подвижными и более плотно упакованными, чем молекулы HOH в чистой воде. Крупные и одновалентные ионы типа K^+, Rb^+, Cs^+, NH_4^+, Cl^-, Br^-, I^-, NO_3^-, BrO_3^-, IO_3^- и ClO_4^- имеют довольно слабые электрические поля и являются разрушителями сетевой структуры, хотя этот эффект в случае ионов K^+очень слаб. Эти ионы разрушают нормальную структуру воды и не в состоянии обеспечить компенсирующее количество новой структуры.

Помимо влияния на структуру воды ионы обладают другими важными свойствами. Благодаря своей переменной способности гидратировать (конкурировать за воду), воздействуя на диэлектрическую проницаемость водной среды и толщину двойного электрического слоя вокруг коллоидов, ионы существенно влияют на «степень гостеприимства», распространяющуюся на другие присутствующие в водной среде растворенные вещества, а также на вещества, взвешенные в этой среде. Признанием этого факта стал лиотропный ряд Хофмейстера, который упорядочивал ионы в порядке их эффективности во всаливающих или высаливающих белках или по их степени воздействия на другие свойства, в частности на стабильность коллоидов. Следует отметить, что полученный эмпирическим путем ряд Хофмейстера хорошо коррелирует с рядом, построенным на ожидаемых структурных воздействиях различных ионов [27, 28].

2.8.2.5. Взаимодействие воды с нейтральными группами, способными к водородному связыванию (с гидрофильными растворенными веществами)

Взаимодействия между водой и неионными гидрофильными растворенными веществами слабее водно–ионных взаимодействий и имеют примерно ту же силу, что и водородные связи «вода–вода». В зависимости от силы водородных связей «вода–растворенное вещество» вода первого слоя (непосредственно примыкающая к гидрофильному веществу) может как проявлять, так и не проявлять пониженную подвижность и другие измененные свойства по сравнению с водой объемной фазы.

На первый взгляд можно было бы ожидать, что растворенные вещества, способные к водородному связыванию, могут улучшать или, по меньшей мере, не разрушать нормальные структуры чистой воды. Такой упрощенный подход игнорирует важность пространственной ориентации и пространственного расположения молекул для существования жизнеспособной водородно-связанной сети. В некоторых случаях оказывается, что распределение и ориентация участков водородных связей растворенного вещества геометрически несовместимы с существующими в чистой воде. Такие растворенные вещества зачастую оказывают деструктивное воздействие на нормальную трехмерную, тетраэдрально ориентированную структуру чистой воды. Хорошим примером водородно-связанного растворенного вещества, которое по геометрическим причинам может оказывать заметный деструктивный эффект на нормальную структуру воды, является мочевина. И наоборот, некоторые молекулы могут иметь потенциально водородно-связанные гидрофильные группы с ориентациями и межатомными расстояниями, совместимыми с водородно-связанными структурами воды, примером чему служат простые углеводы. У их молекул имеются экваториальные гидроксильные группы с пространственными взаимосвязями, сходными с таковыми у молекул воды в кластере (рис. 2.12). Такая степень совместимости может даже повысить общий уровень водородного связывания. Следует отметить, что поскольку расстояния между атомами кислорода в молекулах воды и между отдельными молекулами зависят от температуры, это не означает наличия точного соответствия во всех ситуациях; из этого следует лишь, что существует близкое соответствие и, следовательно, потенциально облегченное взаимодействие.

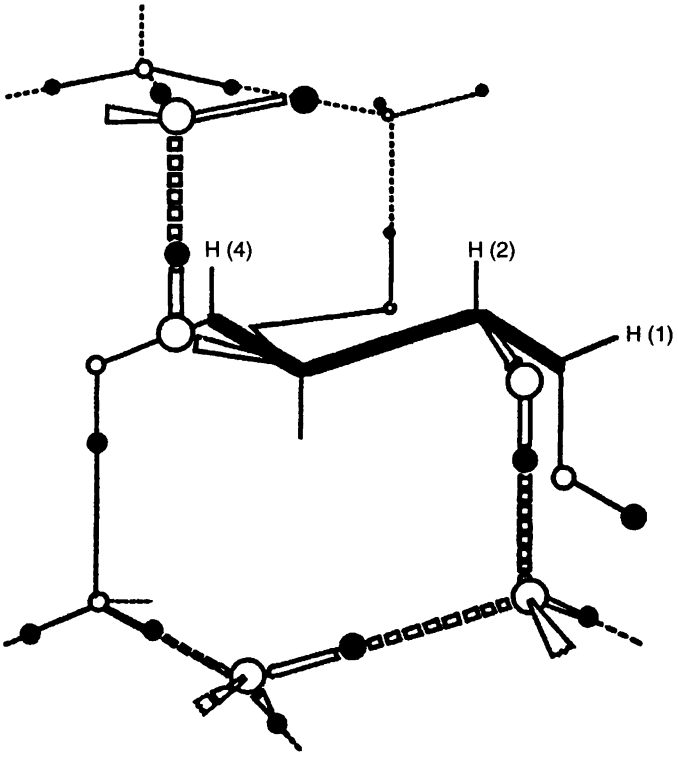


Рис. 2.12. Возможная ассоциация *D*-глюкозы с тетраэдрально расположенными молекулами воды. Жирной линией обозначена боковая проекция пиранозного кольца. Белыми и черными кружками обозначены соответственно атомы кислорода и водорода молекул воды (гидроксиметильные протоны на рисунке не показаны). По [105]

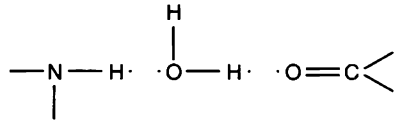


Рис. 2.13. Водородное связывание (показано точками) молекул воды с двумя типами функциональных групп белков

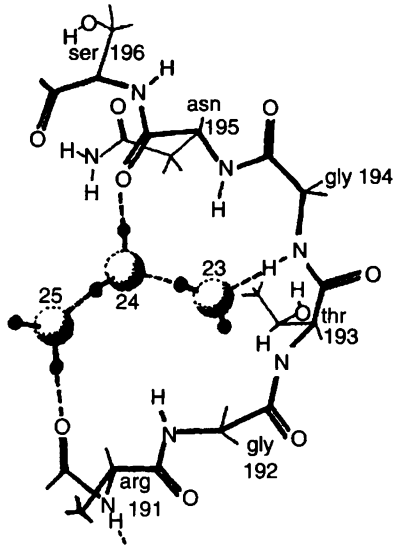


Рис. 2.14. Пример мостика из трех молекул воды в папаине: цифрами 23, 24 и 25 обозначены молекулы воды в мостике. По [106]

Важно понимать, что общее количество водородных связей на 1 моль воды при добавлении водородно-связанного растворенного вещества, которое разрушает нормальную структуру воды, не может существенно меняться. Это происходит потому, что разрушенные водородные связи «вода–вода» заменяются водородными связями «вода–растворенное вещество». Ведущие себя подобным образом растворенные вещества слабо влияют на ранее определенную «сетевую структуру» воды.

Водородное связывание может иметь место с различными потенциально подходящими группами (например, гидроксильными, карбонильными, амино-, амидо-, иминогруппами и т. д.). Иногда это приводит к образованию «водных мостиков», в которых одна молекула воды взаимодействует с двумя соответствующими участками водородных связей одного или более растворенных веществ. Схематическое представление водородного связывания воды с двумя типами функциональных групп белков показано на рис. 2.13 и обозначено точками, а более сложный пример с мостиком из трех молекул HOH между звеньями пептидного каркаса приведен на рис. 2.14.

Согласно данным работы [29], в некоторых сахарах гидрофильные группы во многих кристаллических макромолекулах расположены на расстояниях, очень сходных с расстояниями между ближайшими соседними атомами кислорода чистой воды. Если такое расстояние в гидратированной макромолекуле преобладает, то это способствует «кооперативному» водородному связыванию, вовлекающему воду первого и второго слоя с увеличением стабильности (времени существования) кластера.

2.8.2.6. Взаимодействие воды с неполярными веществами

Неудивительно, что смешивание воды и гидрофобных веществ (углеводородов, инертных газов и неполярных групп жирных кислот, аминокислот и белков) — это термодинамически неблагоприятное событие

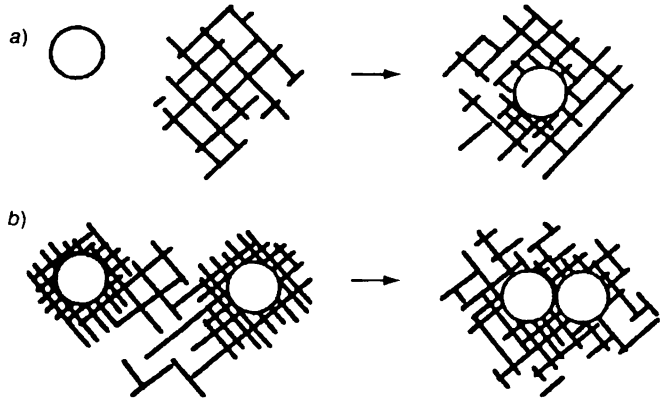


Рис. 2.15. Схематическое отображение гидрофобной гидратации (*a*) и гидрофобной ассоциации (*b*). Кружками обозначены гидрофобные группы, а заштрихованными областями — вода. По [31]

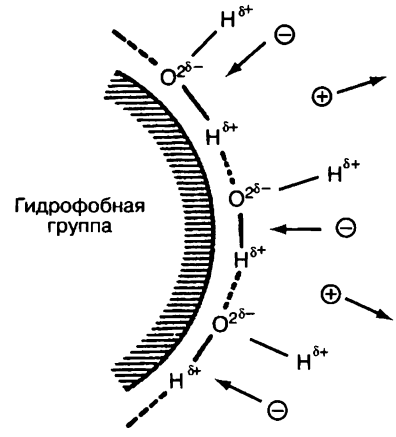


Рис. 2.16. Предполагаемая ориентация молекул воды на гидрофобной поверхности. По [28]

($\Delta G > 0$). Свободная энергия этого процесса положительна, но не потому, что $\Delta H > 0$, что типично для растворенных веществ с низкой растворимостью, а потому, что $T\Delta S < 0$ [30]. Считается, что такое снижение энтропии, рассматриваемое как индикатор увеличения «порядка», происходит благодаря образованию в воде особых структур вблизи этих несовместимых неполярных веществ. Такой процесс называют «гидрофобной гидратацией» (см. табл. 2.4 и рис. 2.15, *a*).

Поскольку гидрофобная гидратация термодинамически неблагоприятна, система стремится адаптироваться в попытке минимизировать ассоциацию воды с присутствующими неполярными веществами. Таким образом, если существуют две обособленные неполярные группы, то их несовместимость с водным окружением стимулирует их ассоциацию, тем самым уменьшая поверхность раздела фаз «вода – неполярное вещество». Этот процесс термодинамически благоприятен ($\Delta G < 0$). Такой процесс, частично обратный гидрофобной гидратации, называют «гидрофобным взаимодействием» [31]. В простейшей форме его можно представить как R (гидратированная) + R (гидратированная) → R_2 (гидратированная) + H_2O, где R — неполярная группа (см. табл. 2.4 и рис. 2.15, *b*).

Поскольку вода и неполярные группы существуют в антагонистической взаимосвязи, то структура воды адаптируется для минимизации контакта с неполярными группами. Предполагаемый тип структуры воды в слое, ближайшем к неполярным группам, представлен на рис. 2.16. Дальнейшего рассмотрения заслуживают два аспекта этой антагонистической взаимосвязи: образование клатратных гидратов и ассоциация воды с гидрофобными группами в белках.

2.8.2.6.1. Клатратные гидраты

Клатратный гидрат — это льдоподобное включение, в котором вода — вещество-«хозяин» — образует водородно-связанную ячейку, которая физически захватывает небольшую неполярную молекулу-«гостя». Такие клатратные гидраты интересны тем, что они представляют собой наиболее экстремальную структурообразующую реакцию воды на неполярное вещество, а также тем, что микроструктуры сходного типа могут нативно присутствовать в биологическом материале. Клатратные гидраты могут быть кристаллическими и легко расти до видимых размеров, причем некоторые из них при достаточном давлении стабильны при температурах выше 0 °C [32]. Молекулы-«гости» клатратных гидратов — это, как правило, низкомолекулярные соединения, размеры и формы молекул которых совместимы с размерами ячеек воды-«хозяина», включающие от 20 до 74 молекул воды. Типичными подобными «гостями» являются низкомолекулярные и галогенизированные углеводороды, инертные газы, низкомолекулярные первичные, вторичные и третичные амины, соли алкиламмония, сульфония и фосфония. Прямое взаимодействие между водой и «гостем» невелико и обычно не включает ничего, кроме слабых Ван-дер-Ваальсовых сил, так что молекула-

«гость» зачастую свободно вращается внутри полости клатрата. Клатратные гидраты — это экстремальный результат стремления воды минимизировать контакт с гидрофобными группами. Несмотря на то что на первый взгляд структура воды в клатратном гидрате существенно отличается от структуры льда, эта структура обусловлена небольшим изменением геометрии водородной связи. В состоянии льда молекулы воды тетраэдрально координированы со своими соседями, их водородные связи располагаются в конформации со смещением (при взгляде вдоль направления связи «кислород–кислород»), тогда как в клатратном гидрате геометрия тетраэдрической координации молекул воды имеет перекрытия (рис. 2.17). Поворот ориентации связей на 60° приводит к образованию структуры, в которой три из четырех водородных связей молекулы воды могут содействовать образованию криволинейной поверхности ячейки, а четвертая водородная связь направлена по нормали к этой поверхности. Таким образом, отсутствуют водородные связи, направленные внутрь полости и, следовательно, неблагоприятное взаимодействие с какой-либо неполярной группой внутри этой полости. Как мы уже отмечали, небольшая неполярная молекула в полости может свободно вращаться. Важно также следующее обстоятельство: если рассчитать свободную энергию структуры льда и клатратной ячейстой структуры (при отсутствии молекул-«гостей» в ячейках), то структура льда окажется более стабильной, чем структура «пустого» клатрата, но лишь на небольшую величину. Таким образом, присутствие подходящего «гостя», стабилизирующего полость путем пространственных взаимодействий, может привести к образованию кристаллической структуры, намного более стабильной, чем лед [33, 34].

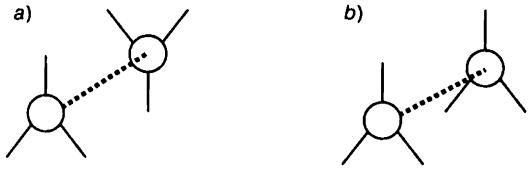


Рис. 2.17. Сравнительная ориентация водородно-связанных молекул воды: *a* — конформация со смещением (лед); *b* — конформация с перекрытием (клатрат)

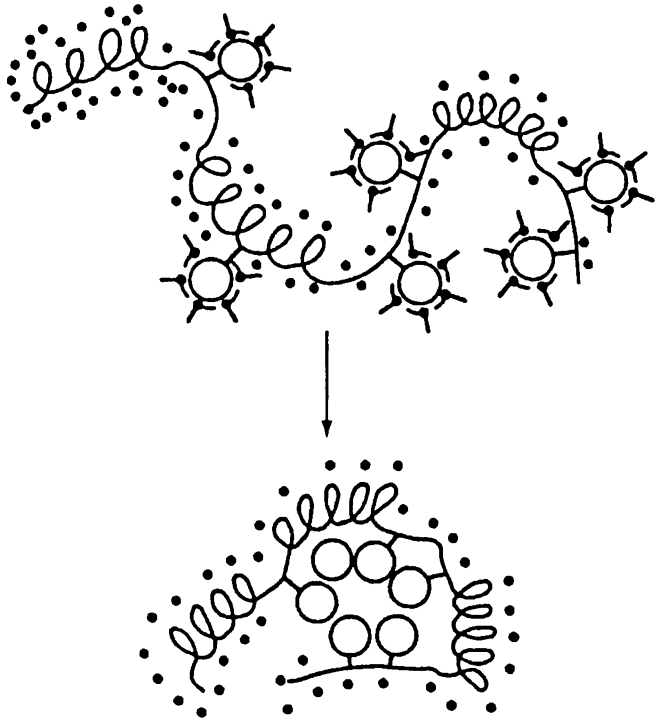


Рис. 2.18. Схематическое представление глобулярного белка, подвергающегося гидрофобному взаимодействию. Белыми кружками обозначены гидрофобные группы, а петлями — молекулы воды, ориентированные в соответствии с их близостью к гидрофобной поверхности. Черными точками обозначены молекулы воды, связанные с полярными группами

Имеются данные, что в биологическом материале могут нативно существовать водородно-связанные структуры, сходные с кристаллическими клатратными гидратами, но более компактные (т. е. водородно-связанные мультимеры с перекрывающейся ориентацией) [35–37]. Если это на самом деле так, то для пищевой науки такие локализованные структуры будут иметь значительно большее значение, чем кристаллогидраты, поскольку они, по всей вероятности, будут влиять на конформацию, реакционную способность и стабильность белковых молекул. Так, предполагается, что частичные клатратные структуры могут существовать вокруг открытых гидрофобных групп белков [38] (см. рис. 2.16 и 2.18). Клатратоподобные структуры воды могут играть определенную роль и в анестезирующем действии инертных газов, в частности ксенона. Подробнее о клатратных гидратах см. работу [32].

Молекулярное динамическое моделирование водных систем с неполярными включениями предоставляет дополнительные данные о возможной переориентации водородной связи «вода–вода» в ориентацию клатратного типа при ответной реакции на присутствие неполярного вещества. Хотя результаты мо-

лекулярного моделирования не показывают структуры с геометрическими формами водородных связей, сходными с ориентациями клатратного типа, сдвиг в среднем направлении связей согласуется с упрощенной графической моделью. В моделях с гидрофобными включениями растворенных веществ наблюдается тенденция к ориентации водородных связей по касательной к поверхностям молекул [7].

2.8.2.6.2. Взаимодействие воды со сложными молекулярными структурами

Несмотря на то что экспериментальное определение расположения молекул воды вблизи органических молекул связано со значительными трудностями, эти исследования дают весьма полезные данные. Гидратированное пиранозное кольцо сахара приведено на рис. 2.12, а на рис. 2.19 представлен результат компьютерного моделирования поперечного разреза миоглобина [39]. Исходя из предположения, что расстояние между участками гидратации составляет 2,8 Å и эти участки полностью заполнены, в первичной гидратной оболочке миоглобина будут находиться около 360 молекул HOH.

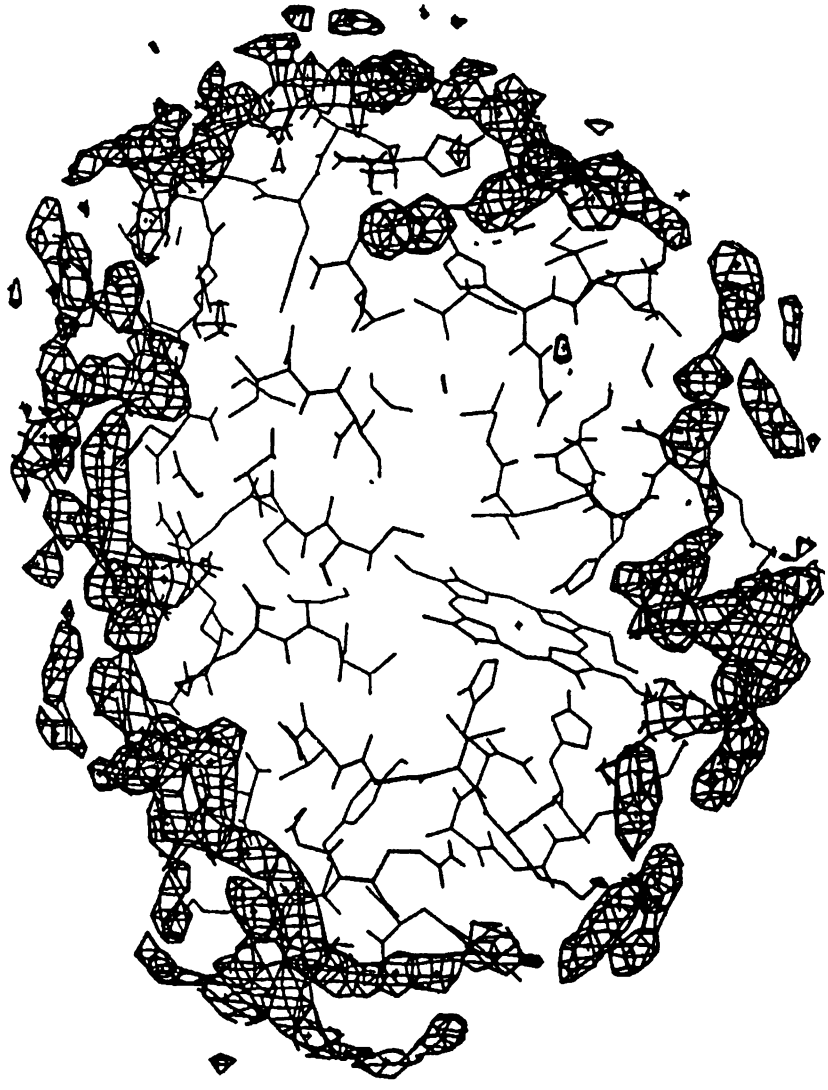


Рис. 2.19. Поперечный разрез гидратированной молекулы миоглобина по данным молекулярного динамического моделирования. Периферические ячейки сети представляют высоковероятную локализацию молекул воды первого слоя. Цепочки внутри ячейки представляют усредненную по времени структуру белка. По [39]

Учитывая сосуществование в крупной молекуле полярных, гидрофильных и гидрофобных областей, неотвратимы неизбежные их взаимодействия и интерференции. В белках, например, неизбежная ассоциация воды с определенными гидрофобными группами оказывает большое влияние на функциональные свойства [11, 30, 38]. Степень этих неизбежных контактов весьма велика, поскольку в типичных олигомерных пищевых белках неполярные боковые звенья присутствуют примерно у 40% аминокислот. К таким неполярным группам относятся метильная группа аланина, бензойная группа фенилаланина, изопропиловая группа валина, меркаптометиловая группа цистеина, а также вторичные бутиловые и изобутиловые группы лейцинов (альфа-аминоизокапроновых кислот). В гидрофобных взаимодействиях также могут участвовать неполярные группы других соединений, в частности спиртов, жирных кислот и свободных аминокислот, но последствия этих взаимодействий менее важны, чем взаимодействии с участием белков.

Ассоциация гидрофобных групп и гидрофобное взаимодействие облегчается тем, что взаимодействие неполярных групп белков с водой термодинамически неблагоприятно (см. рис. 2.18). Считается, что гидрофобное взаимодействие является основной движущей силой свертывания белка, вынуждая многие гидрофобные остатки занимать позиции, заглубленные внутрь молекулы белка. Тем не менее, несмотря на такие гидрофобные взаимодействия, считается, что неполярные группы глобулярных белков обычно занимают около 40–50% площади поверхности. Из-за расположенных на поверхности гидрофобных групп гидрофобные взаимодействия расцениваются как первостепенно важные для сохранения третичной структуры (ассоциации субъединиц и т. д.) большинства белков [40, 41], и поэтому для структурной сложности белков весьма важен тот факт, что при снижении температуры гидрофобные взаимодействия ослабевают, а водородные связи усиливаются.

Последние данные молекулярного моделирования при изучении сольватационных эффектов растворенных веществ подтверждают важность ассоциаций молекул воды на основе водородных связей и свидетельствуют, что основной эффект растворенных веществ — это модулирование (корректировка) ассоциаций на основе водородных связей в чистом растворителе. Это, в частности, отражает изменения, индуцируемые в чистом растворителе изменениями температуры и давления, отражаемые уравнением состояния растворяющей воды [42].

Приведенное описание свойств воды и водных растворов дает хорошую основу для понимания роли воды в пищевых системах, а также влияния ее количества и характеристик на химические и микробиологические показатели пищевых продуктов. Далее мы расмотрим различные подходы к пониманию роли воды при определении свойств и стабильности пищевых продуктов.

2.9. Активность воды и относительное давление водяного пара

2.9.1. Введение

Общепризнано, что между содержанием влаги в пищевом продукте и его склонностью к порче существует определенная зависимость, хотя и непрямая. Технологии концентрации и обезвоживания применяются в основном в целях снижения содержания влаги в продукте, одновременного повышения концентрации растворенных веществ и, тем самым, для уменьшения склонности к порче.

Известно, что различные типы пищевых продуктов с одинаковым содержанием влаги существенно различаются по склонности к порче. Очевидно, что один показатель содержания влаги не может служить надежным индикатором склонности продукта к порче. Это может быть частично объяснено различиями в силе связей воды с неводными компонентами — можно ожидать, что вода, включенная в сильные ассоциации, менее способна поддерживать процессы порчи, обусловленные ростом микроорганизмов и гидролитическими химическими реакциями, чем слабо ассоциированная вода. Для отражения интенсивности связи воды с различными неводными компонентами были введены понятие и термин «активность воды» (a_w).

По показателю a_w стабильность пищевого продукта, его безопасность и другие свойства можно прогнозировать намного более надежно, чем по показателю содержания влаги, однако даже в этом случае значение a_w не является полностью надежным прогнозным показателем (причины этого мы рассмотрим далее). Несмотря на этот недостаток, значение a_w достаточно хорошо коррелирует со скоростями роста микроорганизмов и скоростями многих реакций порчи, что делает его полезным индикатором потенциальной ста-

бильности и микробиологической безопасности продукта. Тот факт, что значение a_w точно определяется в некоторых нормативных актах США, предписывающих применение в производстве пищевых продуктов «правильных производственных практик», свидетельствует о его полезности и надежности [43], а также о важности более полного исследования этого вопроса.

2.9.2. Определение и измерение

Как следует из большинства учебников по физической химии, понятие «активность» вещества Льюис и Рэндалл вывели из законов термодинамики, а Скотт [44 ,45] первым применил его к пищевым продуктам. Здесь достаточно указать, что

$$a_w = (f/f^0)_T, \tag{2.1}$$

где f — фугитивность (летучесть) растворителя (способность растворителя улетучиваться из раствора), а f^0 — летучесть чистого растворителя в некотором определенном стандартном состоянии. Нижний индекс T указывает на измерение при постоянной температуре. При низких давлениях (например, атмосферном) разница между f/f^0 и p/p^0 составляет менее 1%, так что определение a_w в терминах p/p^0 вполне допустимо. Таким образом,

$$a_w = (p/p^0)_T \tag{2.2}$$

Здесь не следует забывать, что это равенство основано на допущении термодинамического равновесия. Поскольку в случае пищевых продуктов это предположение обычно нарушается, то уравнение 2.2 следует рассматривать как приближенное, и правильным выражением является

$$a_w \approx (p/p^0)_T \tag{2.3}$$

Поскольку отношение p/p^0 (хотя оно иногда и не равно a_w) легко измерить, в пищевой науке более уместно использовать показатель $(p/p^0)_T$, а не a_w, и здесь мы будет следовать этому правилу. Значение $(p/p^0)_T$ называют также относительным давлением водяного пара (*RVP*), и эти термины мы будем использовать взаимозаменяемо. Несмотря на научную правомерность использования вместо значения a_w значения *RVP*, так как последнее не предполагает состояния термодинамического равновесия, следует понимать, что понятие a_w широко используется на практике и в других главах этой книги, и если человек понимает его истинное значение и ограничения его применения, то такое использование вполне допустимо.

Несостоятельность подхода a_w–*RVP* как идеального прогнозного показателя стабильности пищевого продукта обусловлена двумя основными причинами: нарушением допущений, лежащих в основе уравнения 2.2, и специфическим влиянием растворенных веществ. Нарушение допущений уравнения 2.2 может неоправданно принижать полезность *RVP* как технологического показателя, но, к счастью, обычно этого не происходит. Исключением являются случаи, когда сухие продукты получают путем абсорбции, а не десорбции влаги (эффект гистерезиса), и их мы рассмотрим далее. Нарушение допущений уравнения (2.2), однако, действительно не позволяет использовать показатель *RVP* как инструмент для механистической интерпретации явлений в тех случаях, когда теоретические модели основаны на обоснованности этих допущений. Зачастую это относится к моделям изотерм сорбции влаги, где при применении очевидных выводов следует проявлять особую осторожность.

В некоторых очень важных случаях специфическое влияние растворенных веществ может сделать *RVP* плохим индикатором стабильности и безопасности пищевых продуктов даже если допущения уравнения (2.2) полностью выполняются. В таких ситуациях пищевые продукты с одинаковым *RVP*, но с различным составом растворенных веществ могут иметь разные стабильность и другие свойства. Этот момент нельзя упускать из вида, полагаясь на *RVP* как на показатель оценки безопасности и стабильности пищевого продукта. Это подтверждается данными, приведенными на рис. 2.20, ясно свидетельствующими, что минимальное значение $(p/p^0)_T$ для роста золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) зависит от типа растворенного вещества [46].

Относительное давление водяного пара связано с равновесной относительной влажностью (РОВ) окружающей продукт среды (в процентах) следующим образом:

$$RVP = (p/p^0)_T = \text{РОВ}(\%)/100. \tag{2.4}$$

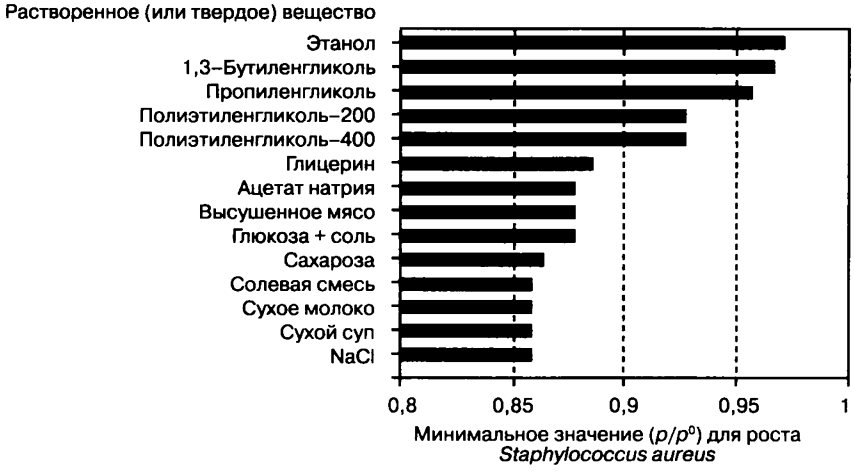


Рис. 2.20. Минимальные значения *RVP* для роста *Staphyloccus aureus* в зависимости от типа растворенного вещества, используемого для регулирования *RVP*, при температуре, близкой к оптимальной для роста этого микроорганизма. По [46]

Это соотношение примечательно в двух аспектах. Во-первых, *RVP* — это внутреннее свойство образца, тогда как РОВ (%) является свойством окружающей среды, находящейся с образцом в устойчивом состоянии, причем наличие такого устойчивого состояния отнюдь не обязательно обеспечивает наличие равновесия. Во-вторых, равенство в уравнении (2.4) наблюдается только при условии, что между продуктом и окружающей средой установлено равновесие, а установление равновесного состояния — это процесс, занимающий много времени даже для очень небольших образцов (массой менее 1 г), и достичь его для крупных образцов, особенно при температурах ниже 20 °С, почти невозможно.

Так как РОВ предполагает состояние равновесия, правильнее использовать это соотношение в модифицированной форме, которая более корректно связывает измеряемое *RVP* со стационарной относительной влажностью (СОВ, *SSRH, steady-state relative humidity*) среды, окружающей продукт:

$$RVP = (p/p^0)_T \approx \text{СОВ}(\%)/100. \tag{2.5}$$

RVP небольшого образца можно определить, поместив его в закрытую камеру на некоторое время, достаточное для достижения видимого равновесия (постоянного веса) и затем измерив давление или относительную влажность в камере [47–50]. Существуют различные типы приборов для измерения давления (манометры) и относительной влажности (электрические гигрометры, гигрометры по точке росы) [51]. Для определения *RVP* можно также использовать знание темпов снижения температуры замерзания, хотя оно точно соотносится только с температурой в точке замерзания. На основе многих исследований было показано, что погрешность определения a_w составляет около ±0,005 [48].

Если требуется получить определенное *RVP* небольшого образца, то это можно сделать путем помещения образца в закрытую камеру с постоянной температурой и хранения его в ней при постоянной и известной относительной влажности воздуха в камере, поддерживаемой с помощью соответствующего насыщенного солевого раствора или другого эквивалентного способа, до достижения постоянного веса образца.

2.9.3. Температурная зависимость

Относительное давление пара зависит от температуры, и для оценки этой температурной зависимости может использоваться уравнение Клаузиуса–Клапейрона в модифицированной форме. Это уравнение, хоть и основанное на a_w, может зачастую применяться к *RVP* в форме

$$\frac{d\ln a_w}{d(1/T)} = \frac{-\Delta H}{R}, \tag{2.6}$$

где T — абсолютная температура; R — газовая постоянная; ΔH — изостерическая теплота сорбции при определенном содержании влаги в образце.

Это уравнение можно преобразовать в обобщенное уравнение для прямой линии, и тогда очевидно, что график $\ln a_w$ относительно $1/T$ (при постоянном содержании влаги) должен быть линейным. Если это верно для $\ln(p/p^0)_T$ относительно $1/T$, то данное уравнение можно использовать для оценки эффективной теплоты сорбции в целях сравнения. Эти зависимости предполагают, что было достигнуто равновесие, но данное условие зачастую не выполняется.

Линейные графики $\ln(p/p^0)_T$ относительно $1/T$ для нативного крахмала при различном содержании влаги представлены на рис. 2.21. Очевидно, что степень температурной зависимости является функцией содержания влаги. При начальном значении $(p/p^0)_T = 0{,}5$ температурный коэффициент равен 0,0034 K^{-1} в диапазоне температур 275–313 K (2–40 °C). По данным нескольких работ [48, 52] у пищевых продуктов с высоким содержанием углеводов или белков температурные коэффициенты для $(p/p^0)_T$ (диапазон температур 5–50 °C, начальное $(p/p^0)_T = 0{,}5$) варьируют от 0,003 до 0,02 K^{-1}. Таким образом, при изменении температуры на 10 K значения $(p/p^0)_T$ в зависимости от продукта могут меняться на 0,03–0,2. Такое поведение важно для расфасованных пищевых продуктов, поскольку их *RVP* при изменении температуры будет меняться, что делает температурную зависимость его стабильности более сильной по сравнению с тем же продуктом, но не расфасованным.

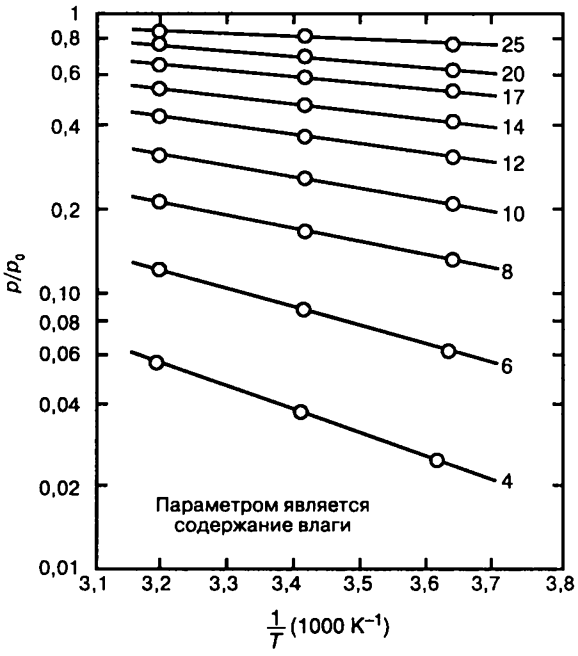


Рис. 2.21. Зависимость между *RVP* и температурой для нативного крахмала с различным содержанием влаги. Значения содержания влаги рядом с линиями выражены в г НОН/г сухого крахмала. По [107]

Графики зависимости $(p/p^0)_T$ от $1/T$ в широких интервалах температур не всегда линейны — например, в начале образования льда они обычно имеют острые изломы. Перед интерпретацией данных для температур ниже точки замерзания необходимо рассмотреть определение *RVP* при этих температурах. Как мы уже отмечали, переохлажденная вода при температурах ниже 0 °C может существовать в метастабильном состоянии. Следовательно, возникает вопрос, должен ли знаменатель p^0 (давление пара чистого растворителя) быть равен давлению пара переохлажденной воды или давлению пара льда. Хотя чистый лед — это равновесная форма чистой воды при этих температурах, оказывается, что для сравнений с системами выше точки замерзания наиболее адекватным выбором для стандартного состояния является давление пара переохлажденной воды. Это обусловлено двумя причинами. Во-первых, значения *RVP* при температурах ниже точки замерзания могут прямо сравниваться только со значениями *RVP* при температурах выше точки замерзания. Во-вторых, выбор давления пара льда в качестве определения p^0 привел бы для содержащих лед образцов к ситуации, в которой *RVP* будет равно единице при всех температурах ниже точки замерзания, поскольку из стандартных термодинамических соотношений следует, что парциальное давление воды в любом замороженном пищевом продукте равно давлению пара льда при той же температуре (рис. 2.22).

Поскольку давление пара переохлажденной воды измерялось только до −15 °C и оценивалось путем экстраполяции до −30 °C (см. табл. 2.3), а давление пара льда измерялось до значительно более низких температур, для замороженных пищевых продуктов проще вычислить значения *RVP*, основанные на стандартном состоянии переохлажденной воды:

$$a_w = \left[\frac{p_{ff}}{p^0(UCW)}\right]_T = \left[\frac{p_{\text{льда}}}{p^0(UCW)}\right]_T \qquad (2.7)$$

где p_{ff} — парциальное давление воды в частично замороженном продукте, $p^0(UCW)$ — давление водяного пара чистой переохлажденной воды, а $p_{\text{льда}}$ — давление водяного пара чистого льда при одной и той же температуре T.

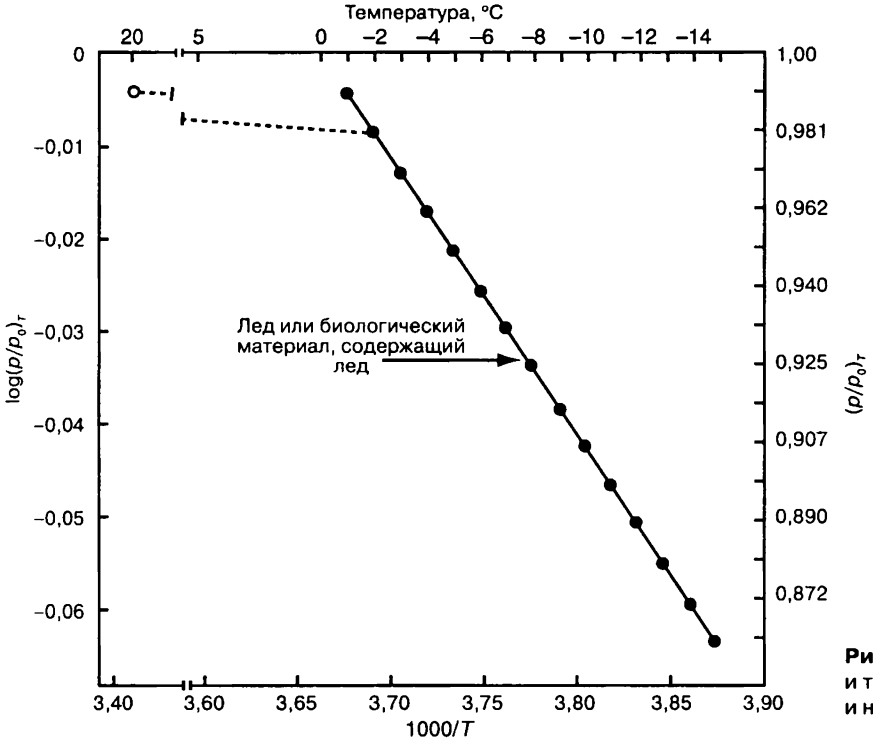


Рис. 2.22. Зависимость между RVP и температурой для водных систем выше и ниже точки замерзания. По [108]

При сравнении значений *RVP* при температурах выше и ниже точки замерзания необходимо учитывать два важных момента.

Во-первых, при температурах выше точки замерзания *RVP* является функцией состава и температуры образца с преобладанием первого фактора. При температурах же ниже точки замерзания *RVP* становится независимым от состава образца и зависит исключительно от температуры, так как в присутствии фазы льда тип или соотношение присутствующих растворенных веществ уже не влияют на значения *RVP* [53]. В результате любое событие при температурах ниже точки замерзания, на которое влияют тип присутствующего растворенного вещества (например, диффузионные процессы, катализированные реакции и реакции, зависящие от присутствия или отсутствия криопротекторов, бактерицидных добавок и/или химических веществ, изменяющих значение pH и окислительно-восстановительный потенциал), невозможно точно спрогнозировать на основании значения *RVP*. Следовательно, значения *RVP* при температурах ниже точки замерзания — это значительно менее ценные индикаторы физических и химических процессов, чем значения *RVP* при температурах выше точки замерзания. Из этого следует, что знание *RVP* при температуре ниже точки замерзания нельзя использовать для прогнозирования *RVP* при температуре выше точки замерзания. Отметим также, что использование скорости снижения точки замерзания для оценки a_w или *RVP* является на самом деле определением точки разрыва кривой.

Во-вторых, поскольку температура достаточно изменяется для образования и таяния льда, меняется также значимость *RVP* для стабильности пищевого продукта. Например, в продукте при −15 °C ($(p/p^0)_T = 0{,}86$) микроорганизмы не размножаются, и химические реакции протекают медленно, однако при +20 °C и $(p/p^0)_T = 0{,}86$ некоторые химические реакции протекают довольно быстро, и некоторые микроорганизмы также достаточно быстро размножаются.

Эта недостаточная полезность *RVP* как индикатора стабильности пищевого продукта при температурах ниже точки замерзания послужила одним из стимулов для разработки подхода к пониманию зависимостей стабильности пищевых продуктов, основанного на молекулярной подвижности, который мы рассмотрим ниже. Анализ изотерм сорбции влаги, отображающих зависимость между содержанием влаги и *RVP* образца и увязывающих эти показатели со стабильностью пищевых продуктов, лучше провести

после рассмотрения молекулярной подвижности, поскольку понятия, используемые в этом подходе, помогают прояснить некоторые зависимости между изотермами сорбции влаги и стабильностью продукта.

2.10. Молекулярная подвижность и стабильность пищевого продукта

2.10.1. Введение

Несмотря на то что основанный на *RVP* подход хорошо себя зарекомендовал в пищевой промышленности, это не должно препятствовать рассмотрению других подходов, которые могут служить дополнением или частичной заменой *RVP* как средства прогнозирования и контроля технологичности и стабильности пищевых продуктов. Накопились убедительные факты, свидетельствующие о том, что молекулярная подвижность (это понятие далее обозначается *Mm, Molecular mobility*, и включает в себя поступательное или вращательное движение) является характеристикой пищевых продуктов, заслуживающей особого внимания, поскольку она причинно связана со многими их важными диффузионными свойствами. При подходе на основе молекулярной подвижности основное внимание уделяется вращательной и поступательной подвижности составляющих молекул. Такой подход к подвижности подразумевает, что необходимо уделять особое внимание диффузионным аспектам многих реакций, в частности, важности ограниченных диффузией реакций для качества многих пищевых продуктов.

2.10.2. Исторический экскурс

Как мы уже отмечали, первыми привлекли внимание к значимости *Mm* биологических материалов для их стеклообразных состояний, перекристаллизации, температуры коллапса при сублимационной сушке работы [19, 20] в США и [22, 23] во Франции. Многие из фундаментальных понятий, относящихся к *Mm* в неравновесных системах из синтетических аморфных полимеров, были сформулированы в работах [54, 55], а в работах [56, 57] была описана важная роль стеклообразных и перенасыщенных состояний в различных сахаросодержащих пищевых продуктах и высказано предположение, что наличие этих состояний существенно влияет на стабильность и технологичность многих пищевых продуктов. В работе [58] была показана важность *Mm* для темпов неферментативного потемнения и окисления аскорбиновой кислоты, благодаря чему были получены дополнительные доказательства важности зависимости между *Mm* и стабильностью пищевого продукта.

2.10.3. Последующие исследования

В дальнейшем события развивались довольно быстро, и в настоящее время *Mm* признана одним из ключевых показателей стабильности пищевых продуктов. Начало современному подходу к *Mm* положили работы [59–65], показавшие, что для понимания стабильности пищевых продуктов можно использовать понятия Ферри в модифицированной форме. Важным шагом вперед стал вывод о том, что водные стекловидные состояния сахаров и другие находящиеся в стекловидном состоянии материалы пищевых систем можно представлять как имеющие свойства, сходные со свойствами аморфных полимеров, описанными Ферри в работе [55], и что аналогичные зависимости могут применяться для оценки поведения сахаров в стекловидном состоянии. В частности, Левин и Слейд предложили использовать для пищевых систем уравнение Вильямса–Ландела–Ферри («уравнение ВЛФ») в форме

$$\log\frac{\eta}{\eta_g}=\frac{-C_1\left(T-T_g\right)}{C_2+\left(T-T_g\right)}, \tag{2.8}$$

где η — вязкость продукта при температуре T (К); η_g — вязкость продукта при температуре T_g (К) (обычно это температура стеклования); C_1 и C_2 (К) — константы, причем первая из них безразмерная. Вязкость η можно заменить на $1/Mm$, на молекулярную подвижность или на любой другой ограниченный диффузией релаксационный процесс. Это уравнение описывает зависимость вязкости системы и других обусловленных диффузией процессов от поведения аморфного состояния полимера. В полимерных системах для C_1

и C_2 были установлены универсальные значения, но можно ли эти значения использовать применительно к пищевым стекловидным системам является вопросом дискуссионым.

2.10.4. Скорость реакций в растворе

Прежде чем рассмотреть понятие молекулярной мобильности как фактора, влияющего на скорости реакций в лимитированных диффузией системах, важно отметить, что при комнатной температуре химические реакции в водном растворе зачастую не лимитируются диффузией. В условиях постоянных температур и давления скорость химической реакции завит от трех основных факторов: диффузии (D), описывающей вероятность столкновений, частоты столкновений (A), определяющей количество столкновений в единицу времени, и химического фактора энергии активации (E_a), определяющей энергетический барьер, который преодолевается при столкновении между должным образом ориентированными реагентами. Последние два фактора присутствуют в уравнении Аррениуса, описывающем температурную зависимость константы скорости реакции. Чтобы реакция была лимитирована диффузией, значения A и E_a не могут ограничивать скорость реакции; другими словами, чтобы гарантировать, что столкновения с высокой вероятностью вызовут реакцию, должным образом ориентированные реагенты должны сталкиваться с большой частотой и с достаточно низкой энергией активации. Лимитированные диффузией реакции поэтому обычно характеризуются низкой энергией активации (8–25 кДж/моль). Большинство «быстрых реакций» (небольшая E_a, большая A) относятся к лимитированным диффузией. Примеры таких реакций — это реакции передачи протона, реакции между кислотами и основаниями, многие реакции, катализируемые ферментами, свертывание белков, увеличение полимерной цепи, реакции рекомбинации радикалов, оксигенация и дезоксигенация гемоглобина и миоглобина. Предварительным свидетельством лимитированной диффузией реакции является константа скорости от 10^{10} до 10^{11} M^{-1} c^{-1}. Скорость, лимитированная диффузией, — это максимальная скорость, возможная для реакции в растворе (из предположения, что это традиционные механизмы реакции).

Кроме того, важна зависимость коэффициента диффузии от вязкости и температуры. Константа скорости лимитированной диффузией реакции второго порядка для незаряженных сферических частиц задается уравнением Смолучовского:

$$k_{dif} = \frac{4\pi N_A}{1000}(D_1 + D_2)r, \tag{2.9}$$

где N_A — число Авогадро; D_1 и D_2 — коэффициенты диффузии для частиц 1 и 2; r — расстояние максимального сближения частиц 1 и 2, представленное в виде суммы их радиусов.

Согласно уравнению Стокса–Эйнштейна,

$$D = kT/\pi\beta\eta r_s, \tag{2.10}$$

где k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура; β — числовой коэффициент; η — вязкость; r_s — гидродинамический радиус диффундирующих веществ.

Так как вязкость с уменьшением температуры в ВЛФ-области быстро возрастает, особенно интересна зависимость D (и, следовательно) k_{dif} от вязкости.

Вполне вероятно, что скорости некоторых реакций в пищевых продуктах с высоким содержанием влаги при комнатной температуре являются лимитированными диффузией, тогда как скорости других реакций от нее не зависят. Можно ожидать, что скорости реакций, лимитированных диффузией, при снижении температуры или при уменьшении содержания влаги будут соответствовать ВЛФ-кинетике.

2.10.5. Влияние молекулярной подвижности на стабильность пищевых продуктов

Основная идея связи между молекулярной подвижностью и стабильностью пищевых продуктов очень проста. По мере охлаждения пищевого продукта подвижность молекул снижается. Это нормальное следствие понижения температуры. Различным видам молекул в пищевом продукте, естественно, присуща своя характерная мобильность. Здесь возможны два сценария. В случае более простого сценария при сни-

жении температуры в некоторый момент времени подвижность крупных молекул становится настолько ограниченной, что их диффузия существенно лимитируется, и процессы, зависящие от подвижности молекул, заметно замедляются. При некоторой более низкой температуре ограничивается и движение молекул среднего размера, и свойства системы и ее реакции свидетельствуют о повышенной температурной зависимости в том диапазоне температур, в котором подвижность молекул ограничена.

В случае более сложного сценария при понижении температуры начинает образовываться новая твердая фаза. Это особенно важно, если твердой фазой является лед (то есть происходит замерзание). По мере образования льда концентрация растворенных веществ в незамороженной водной фазе возрастает. Молекулярная подвижность — это не только функция температуры, но и функция концентрации, так как при более высоких концентрациях столкновения молекул становятся более вероятными. Следовательно, в таких системах при понижении температуры подвижность молекул снижается под влиянием температуры и под влиянием возрастающей концентрации. При понижении температуры сочетание этих факторов приводит к значительно большему уменьшению подвижности молекул, чем, когда снижение температуры является единственным влияющим фактором. Как и в первом сценарии, размер молекул — фактор, характеризующийся при повышенных температурах сильно лимитированной мобильностью крупных молекул по сравнению с молекулами меньшего размера. Поведение замороженных систем, детально изученное за последние 30 с небольшим лет, рассматривается далее в этом разделе в терминах молекулярной мобильности.

Полученные данные свидетельствуют, что *Mm* причинно связана с лимитированными диффузией свойствами пищевых продуктов, которые помимо воды содержат значительные количества аморфных, в основном гидрофильных молекул, размер которых варьирует от мономеров до полимеров. Для *Mm* ключевыми компонентами являются вода и доминирующие растворенные вещества. К пищевым продуктам такого типа относятся крахмалсодержащие продукты, карамельные кондитерские изделия, продукты на белковой основе, продукты с низким и средним содержанием влаги, а также замороженные продукты и продукты сублимационной сушки.

Если пищевой продукт находится в состоянии, характеризующимся значительным снижением *Mm*, то лимитированные диффузией свойства становятся весьма стабильными и со временем меняются очень медленно или вообще не меняются. Следует отметить, что, в отличие от большинства лимитированных диффузией процессов физического изменения, от диффузии зависят не все процессы химических изменений. Иногда доминирующим фактором стабильности пищевого продукта являются химическая реакционная способность, однако лимитированные диффузией процессы зачастую играют важную роль в стабильности пищевых продуктов.

В связи с тем что мы более подробно рассматриваем подход к стабильности пищевых продуктов на основе *Mm*, его следует считать мощным дополнением, а не замещением *RVP* как средства прогнозирования стабильности тех пищевых систем, основным компонентом которых является вода.

2.10.6. Диаграмма состояний

2.10.6.1. Введение

Так как пищевые системы редко находятся в равновесии, для понимания фазового поведения пищевых продуктов традиционные фазовые диаграммы имеют лишь ограниченное применение. В этом случае лучше использовать расширенную форму таких диаграмм, часто называемую диаграммой состояний, так как помимо информации о равновесных фазах она дает информацию о неравновесных, возможно метастабильных «состояниях». Термин «состояние» здесь относится к неравновесному проявлению того, что в равновесном состоянии обозначается как «фаза». Применение этого термина способствует четкому различения результатов наблюдений равновесных и неравновесных состояний. Диаграммы состояний — это по сути «дополненные» фазовые диаграммы.

Упрощенная диаграмма состояний в зависимости от температуры и состава для двухкомпонентной системы приведена на рис. 2.23. Сравним ее с фазовой диаграммой, приведенной ранее на рис. 2.10. В этих диаграммах сплошные линии предполагаются термодинамически определенными, тогда как пунктирные указывают локализацию свойства или параметра, которые являются определенными кинетически

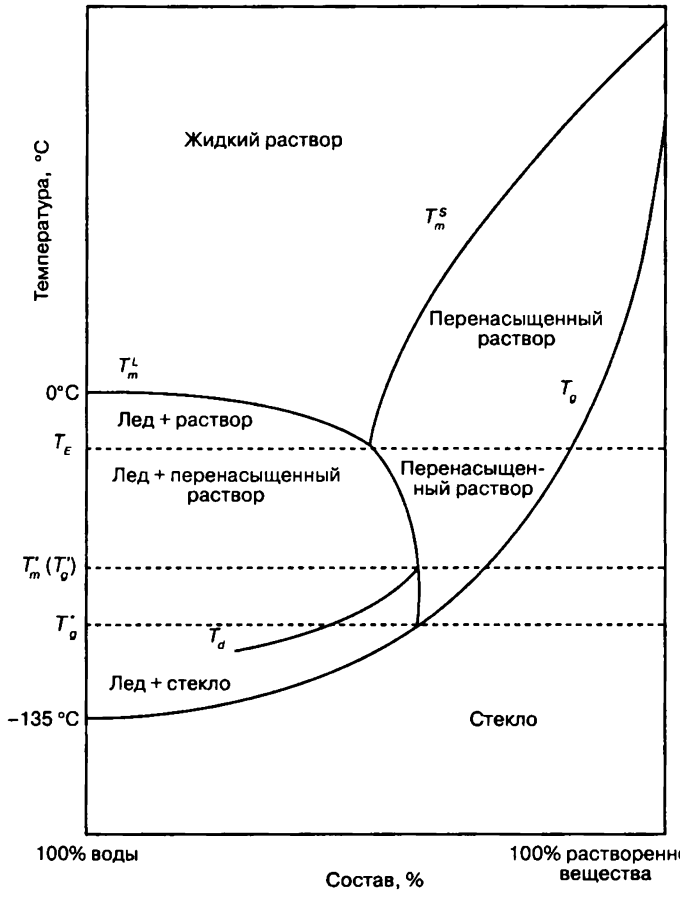


Рис. 2.23. Диаграмма состояний в зависимости от температуры и состава бинарной водной системы. Допущения: максимальное концентрирование замораживанием, отсутствие кристаллизации растворенного вещества, постоянное давление и отсутствие временной зависимости. T_m^L — кривая температуры плавления; T_E — эвтектическая точка; T_m^S — кривая растворимости, T_g — кривая стеклования; T_d — кривая расстеклования; $T_m'(T_g')$ — начало плавления; T_g' — зависящая от растворенного вещества температура стеклования раствора, максимально концентрированного замораживанием

или метастабильными. Обычно эти положения наносят в виде предельных линий, определяющих предполагаемую конечную реальность данного свойства. При использовании таких диаграмм предполагается, что давление остается постоянным, а зависимость метастабильных состояний от времени в интересующих системах равна нулю или не очень важна. Хотя все диаграммы состояний для простых двухкомпонентных систем имеют одинаковую форму, реальные сложные (многокомпонентные) пищевые продукты представить в виде бинарной диаграммы довольно трудно. Тем не менее, при условии, что единственным кристаллизующимся веществом является вода, бинарная диаграмма может с достаточной точностью обеспечить адекватную аппроксимацию поведения состояний сложного пищевого продукта и кривую стеклования. Чтобы использовать такую диаграмму, следует рассматривать совокупность всех неводных компонентов водной фазы как единственное растворенное вещество. Это приемлемо при условии, что никакой компонент неводной смеси веществ не выделяется (кристаллизуется, осаждается или образует отдельную новую жидкую фазу). Так как в большинстве замороженных пищевых продуктов лед является единственным компонентом, выделяющимся из водной фазы, псевдобинарная диаграмма состояний системы может быть легко получена путем построения графика T_m^L как функции концентрации. Вместе с тем следует иметь в виду, что в сложном пищевом продукте различные зоны продукта или различные составляющие молекулы могут существовать в фазах, отличных от фаз других областей или фаз, содержащих другие составляющие молекулы, и таким образом могут потребовать описания несколькими бинарными диаграммами состояний. В такой системе довольно трудной задачей является определение доминирующего компонента или доминирующей области, контролирующей критические свойства. Например, в некоторых системах на основе смеси полимеров происходит разделение фаз с образованием областей, которые могут содержать различные доминирующие виды полимеров. В такой сложной системе трудно идентифицировать наиболее важное стеклование или ограничение подвижности молекул, так как важнейший реагент может находиться в одной или нескольких присутствующих фазах.

2.10.6.2. Интерпретация диаграммы состояний

Теперь можно рассмотреть некоторые ограничения при интерпретации диаграмм состояний. Область диаграммы, которая представляет истинную фазовую диаграмму, обозначенную сплошными линиями, отображает ситуацию стабильного равновесия. Линия температуры таяния льда T_m^L и линия насыщения T_m^S и их пересечение в эвтектической точке E описывают ситуации стабильного равновесия. Расположение

линии T_m^L определяется путем проведения циклов охлаждения и нагревания по данным, собранным в экспериментах нагревания. Продолжение линии T_m^L после точки E описывает новую и более сложную реальность. Во-первых, она существует, если растворенное вещество не кристаллизовалось, что вполне типично. В отсутствие кристаллизации растворенного вещества часть диаграммы со стороны T_m^L для высоких концентраций соответствует перенасыщенному раствору (SS). Таким образом, участок от E до T_g' представляет неравновесное состояние. Продолжение линии T_m^L от E до T_g' принимается как представляющее метастабильное равновесие и соответствует наибольшей концентрации растворенного вещества в (перенасыщенном) растворе, которая может достигаться при любой температуре в результате кристаллизации льда. При любой заданной температуре в системе можно иметь меньшее количество льда и, следовательно, более низкую концентрацию растворенного вещества в зависимости от точной кинетики кристаллизации в ходе охлаждения до этой точки. Чем быстрее происходит охлаждение и чем ниже температура, тем более вероятной становится неполная кристаллизация льда.

При некоторой температуре достигается состояние, когда лед при охлаждении больше не будет выделяться. В идеальной диаграмме оно представлено пересечением линии T_m^L с линией T_g при T_g' с концентрацией растворенного вещества C_g'. Линия T_g соответствует температуре стеклования для гомогенного аморфного матрикса как функции его состава. Отметим, что для определения всей линии T_g от чистой НОН до чистого растворенного вещества, условия охлаждения должны применяться в системах, представляющих весь диапазон концентраций, в котором ни растворенное вещество, ни растворитель не могут кристаллизоваться в результате образования ряда гомогенных стекловидных веществ известной концентрации при соответствующих низких температурах. Достижение этого может представлять трудности, особенно при высоких концентрациях воды, для которых может потребоваться очень быстрое охлаждение в целях предотвращения кристаллизации льда. Кривая T_g для аморфной водной системы простирается от −135 °C для чистой воды до соответствующей T_g для чистого растворенного вещества.

В равновесных системах, в которых имеет место кристаллизация льда, эвтектическая точка E определяет концентрацию C_E, представляющую критическую концентрацию равновесной системы, при которой происходит переход от кристаллизации только одного льда к одновременной кристаллизации льда и растворенного вещества. Только при этой уникальной концентрации фазы раствора лед и растворенное вещество могут кристаллизоваться совместно, причем в постоянном соотношении, эквивалентном соотношению воды и растворенного вещества в жидкой фазе при концентрации C_E. При более высоких исходных концентрациях воды концентрация растворенного вещества C_E достигается за счет кристаллизации льда, а при более высоких исходных концентрациях растворенного вещества — за счет кристаллизации растворенного вещества.

Криобиологи, которых интересовали свойства разбавленных водных стекловидных веществ, активно их изучали [66–68]. Особый интерес для нас представляет тот факт, что при нагревании гомогенного разбавленного стекловидного вещества, начиная с очень низкой температуры, стеклование наблюдается при T_g. В ходе дальнейшего нагревания при некоторой температуре T_d происходит расстеклование с образованием некоторого количества льда (экзотермический процесс) и сопутствующим повышением концентрации растворенного вещества в остаточной стекловидной фазе, приближающейся к максимальной возможной концентрации $(C_g)_T$, определяемой линией T_g при температуре T_d. Этот результат дает основание предполагать, что при T_d молекулярная подвижность растворенного вещества достаточно возросла для некоторой пространственной перегруппировки молекул и образования областей чистой воды в форме льда. Результирующая возросшая концентрация в остаточных областях жидкой фазы приводит к пониженной подвижности растворенного вещества, так что эти области остаются, в сущности, в стеклообразном состоянии с T_g, соответствующей возросшей концентрации растворенного вещества. Точное положение T_d будет зависеть от экспериментальной шкалы времени. Для более длительных шкал времени T_d будет находиться в области более низких температур. Заметим, что поскольку кристаллизация льда является экзотермическим процессом, расстеклование будет самоускоряющимся процессом, и потому легко наблюдается.

Рассмотрим теперь, что происходит, если система, общая концентрация которой является более разбавленной, чем эвтектическая концентрация (C_E), охлаждается медленнее, чем это необходимо для образования гомогенного стекловидного вещества. Предположим, что начальное образование зародышей

льда происходит легко (на практике это не всегда так), и, следовательно, не возникает значительного переохлаждения. По мере охлаждения достигается начальная T_m^L для исходной концентрации, и начинается образование льда. При дальнейшем охлаждении образуется больше льда, и результирующий состав незамороженной фазы следует за линией T_m^L. В конце концов достигается точка E, и если равновесие сохраняется, то растворенное вещество и лед будут совместно кристаллизоваться при температуре T_E в постоянной пропорции, определяемой пропорцией при C_E, пока вся система не затвердеет. При дальнейшем охлаждении температура опять будет снижаться, но без дополнительного изменения концентрации фазы (вертикальный спуск от E). Тем не менее, нуклеация и рост кристаллов растворенного вещества могут быть затруднены, и в этом случае типично перенасыщение. Если происходит перенасыщение, продолжение охлаждения после достижения точки E приводит к образованию дополнительного льда, но без одновременной кристаллизации растворенного вещества, и поэтому концентрация незамороженной фазы продолжает возрастать, следуя за линией T_m^L от E до T_g', где незамороженная фаза переходит в стеклообразное состояние. Эту концентрацию можно обозначить как $(C_m^L)_T$. При $T_g'(C_m^L)_T = C_g'$. Как мы уже отмечали, при увеличении концентрации и при понижении температуры вязкость раствора возрастает. Следовательно, подвижность молекул растворенного вещества в жидкой фазе, особенно крупных молекул растворенного вещества, снижается, и процесс сегрегации, необходимый для образования областей чистой воды в форме льда, занимает больше времени. Продолжение линии T_m^L после E определяет максимальную концентрацию $(C_m^L)_T$, возможную для незамороженной фазы при конкретной температуре. Если скорость кристаллизации льда ограничена (например, быстрым замораживанием), то концентрация растворенного вещества в незамороженной фазе будет меньше $(C_m^L)_T$ при любой заданной температуре ниже T_E. При продолжении охлаждения эта незамороженная фаза в конце концов достигнет температуры и концентрации, которые совпадают с некоторой точкой на линии T_g', представляющей стеклование более разбавленного стекловидного вещества, чем максимально концентрированное замораживанием T_g' стекловидное вещество.

2.10.6.3. Взаимодействие состояния равновесия и кинетики

Фиксация точного места пересечения линии T_m^L с линией T_g стала предметом значительных разногласий. В своих работах Левин и Слейд (*Levin, Slade*) определяли температуру, обозначенную ими как T_g' по ДСК-кривым (ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия). Эта температура по их предположению является температурой стеклования максимально концентрированного замораживанием матрикса. Используя полученные данные, они попытались вычислить концентрацию в этой точке (концентрацию воды W_g' или концентрацию растворенного вещества C_g') [69], но их первоначальные расчеты оказались ошибочными [70–72]. Потребовались дополнительные исследования с определением T_g в более высоко концентрированных резко охлажденных системах или с использованием модифицированного метода оценки содержания льда для получения оценочных значений W_g^* или C_g^* (соответственно содержание воды в стеклоподобном веществе и концентрация стеклоподобноного вещества), приведенных в табл. 2.5. Другие ученые (см. работы [73, 74]) оспаривали характеристику точки T_g' Левина и Слейда как представляющую точку стеклования. Были получены доказательства, что истинное стеклование происходит при более низкой температуре, и выдвинуто предположение, что T_g' в терминологии Левина и Слейда является на самом деле началом плавления, и для идентификации этой точки было предложено использовать обозначение T_m'. В настоящей главе мы используем именно эту терминологию, где T_m' представляет точку, которую первоначально Левин и Слейд обозначали как T_g' Поскольку они считали T_g' значимой температурой для использования в уравнении Вильямса–Ландела–Ферри (ВЛФ) при оценке скорости реакций в замороженных системах, эти дискуссии были весьма важны. Впоследствии было достигнуто понимание, что эта важная температура, возможно, представляет точку, в которой при нагревании процесс плавления льда возникает из кинетических ограничений пониженной подвижности растворенного вещества и следует линии T_m^L , определяющей метастабильность системы. Исходя из этого, ее можно рассматривать как конечную точку предельной кривой T_d, представляющей переход от ограничений подвижности на кристаллизацию льда к ограничениям подвижности на таяние льда. Линия T_d отражает наибольшую температуру, при которой существует эффективное кинетическое ограничение на кристаллизацию льда в системе с зародышами кристаллизации при температурах ниже T_m. Объединяя обе концепции, обозначение T_m' можно рассматривать как отражение «температуры подвижности», при которой в ходе нагрева-

ния преодолеваются ограничения, обусловленные пониженной подвижностью растворенного вещества. Оно отражает температуру, при которой диффузия растворенного вещества в системе, максимально концентрированной замораживанием, может происходить с удовлетворительной скоростью. Как мы покажем далее, эта температура является важным параметром при оценке стабильности и скоростей реакции в замороженных системах, выдерживаемых при температурах ниже точки замерзания, но выше T_m'. Так как T_m' очевидно представляет точку, в которой подвижность растворенного вещества впервые становится достаточной для наблюдения измеримого изменения, она является подходящей опорной температурой для использования в уравнении ВЛФ, оценивающем увеличение подвижности (и его последствия). Предполагается, что в уравнении ВЛФ опорная температура представляет воспроизводимый порог подвижности для множества систем. Очевидно, что при использовании T_m' для представления температуры, при которой система приобретает свою подвижность, критерием служит начало таяния льда, инициированное достаточной диффузией растворенного вещества. Этот факт укрепляет позицию Левина и Слейда в том, что температуру T_m' можно использовать в уравнении ВЛФ для прогнозирования стабильности замороженного продукта. Следует отметить, что концентрация предельно незамороженной системы при T_m' будет очень близка к C_g', поскольку пока подвижность растворенного вещества недостаточна для таяния льда и разбавления незамороженного матрикса, концентрация последнего меняться не будет. Необходимо напомнить, что эта дискуссия относится к идеальному случаю предельных метастабильных систем. В действительности температуры и концентрации определяют в некотором интервале вблизи T_m' и C_g'. Во избежание путаницы в этой главе мы предпочитаем использовать для представления температуры стеклования максимально концентрированного замораживанием стеклоподобного вещества обозначение T_g', а не T_g', учитывая наличие многочисленных определений T_g' в литературе.

Таблица 2.5

Оценочные значения C_g' для некоторых углеводов, По [64]

Углевод	Значения C_g', % масс.		T_m'(К)
	По Левину и Слейду	По другим данным	
Глицерин	54	80	208
Рибоза	67	81	226
Глюкоза	70,9	80	230
Фруктоза	51	83	231
Галактоза	56	83	232
Сахароза	64	81	241
Мальтоза	80	81	244
Мальтотриоза		81	250

2.10.6.4. Распространение этой концепции на сложные пищевые системы

Обладающий некоторыми достоинствами подход должен позволять идентифицировать доминирующее в системе пищевое растворенное вещество и вывести свойства сложного (многокомпонентного) пищевого продукта из бинарной диаграммы состояний для этого растворенного вещества. Полезным примером может быть использование диаграммы состояний системы «вода–сахароза» для прогнозирования свойств и поведения печенья при выпечке и хранении [75]. Если в других ситуациях присутствует более одного основного растворенного вещества, следует рассмотреть диаграмму состояний для каждого растворенного вещества. Важно иметь в виду, что диаграмма состояний создается по результатам наблюдений температур фазы и/или стеклоподобного состояния и связанных с ними превращений (например, расстеклования) как функции содержания влаги в системе. В системах с одним растворенным веществом (или фиксированным соотношением растворенных веществ), которые могут образовать лед, значения T_m' и T_g' совпадают для всех исходных составов (хотя T_d и T_g зависят от конкретного состава), и меняющаяся температура ликвидуса T_m^L может отслеживаться по изменению количества льда (и, следовательно, C_m^L, то есть концентрации жидкой фазы, контактирующей со льдом) при каждой температуре. Тем не менее, в двухкомпонентных системах с меньшим содержанием воды, чем в максимально концентрированном замораживa-

нием матриксе (и, следовательно, не способном к образованию льда), для каждого значения содержания влаги требуется раздельное определение всех температур превращений. Определение T_g при низком содержании влаги обычно осуществимо благодаря редкой кристаллизации растворенного вещества. Тем не менее, определение линии насыщения T_m^S зачастую затруднено из-за неспособности растворенных веществ к кристаллизации до или при их концентрации насыщения. В сложных системах, в которых невозможно идентифицировать доминирующее растворенное вещество (например, в сухих или полусухих многокомпонентных продуктах), определение кривых T_m^S по-прежнему невозможно. Тем не менее, как мы уже отмечали, определение T_m^L — относительно простая задача и, следовательно, для сложного замороженного пищевого продукта можно определить диаграмму состояний. Как диаграмма состояний меняется для различных растворенных веществ показано на рис. 2.24.

Здесь необходимо одно последнее замечание. Хотя при температурах выше T_E T_m^L и T_m^S — это, конечно, линии, значения T_g и T_d — это индикаторы кинетических барьеров, и лучше рассматривать их как полосы. Для кинетического процесса можно ожидать, что точная температура события зависит от «характеристической частоты» или времени отклика собственно измерения [76, 77].

Исследуя диаграмму состояний для больших концентраций растворенного вещества, чем максимальная концентрация замораживанием, можно отметить, что крутизна кривой T_g увеличивается относительно T_m^S, т. е. T_g растворенного вещества. Другими словами, даже небольшое количество воды в растворенном веществе существенно влияет на T_g. Это явление, известное как пластификация, является свойством всех стеклоподобных веществ, к которым добавляются некоторые количества значительно меньших молекул, чем молекулы, подвижность которых определяет стеклование. Распространенное объяснение явлению пластификации основано на рассмотрении свободного объема (пространства между основными молекулами стеклоподобного вещества). Если этот свободный объем увеличивается, движение молекул облегчается с соответствующим снижением температуры стеклования. Небольшие молекулы входят в пространство между крупными молекулами, увеличивая тем самым свободный объем и, следовательно, понижая T_g. Эффективным пластификатором является вода со своими очень небольшими молекулами. Обеспечить пластификацию могут и другие молекулы (например, этанола и глицерина), так как они могут проникать в фазу, образованную молекулами аморфной фазы. Если небольшая молекула на молекулярном уровне не смешивается с более крупной молекулой, то описанное здесь явление пластификации произойти не может, хотя может иметь место эффект «смазки» между отдельными «микрофазными областями». Такая «смазка» влияет на механические свойства, однако термические свойства системы, тем не менее, будут отражать T_g отдельных областей, и кинетика также будет соответствовать их T_g.

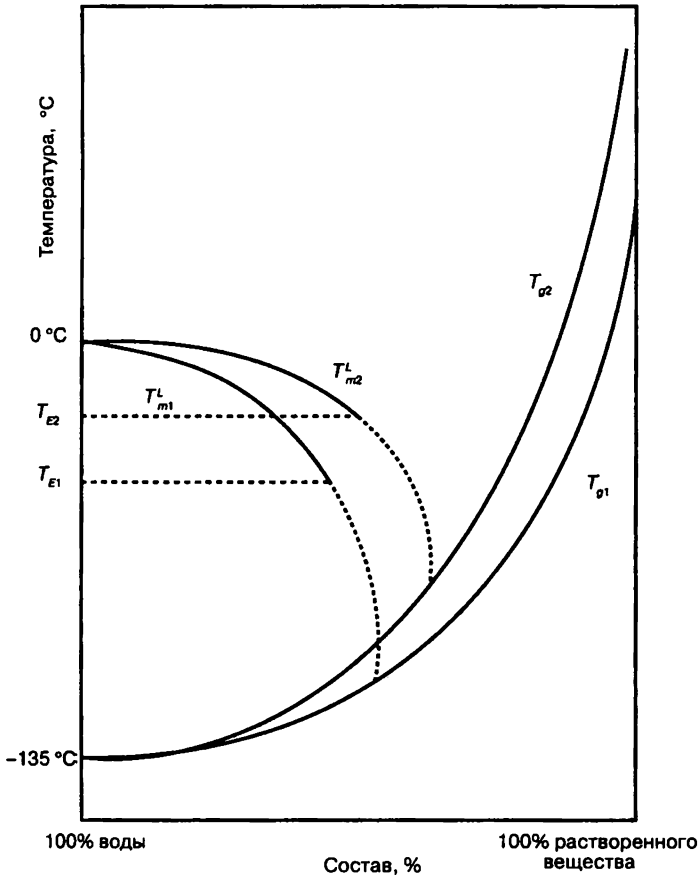


Рис. 2.24. Диаграммы состояний для двухкомпонентных систем, отражающие влияние типа растворенного вещества на кривые T_m^L и T_g. Крайние левые участки T_g фиксируются при температуре стеклования чистой воды (–135 °C). Использованы те же допущения, что и для рис. 2.23

2.10.6.5. Подбор допущений

Применимость основанного на молекулярной подвижности подхода к определению стабильности пищевого продукта зависит от несколько ключевых понятий и допущений. Первая и наиболее важная предпосылка исходит из того, что *многие пищевые продукты содержат аморфные компоненты и существуют в состоянии метастабильного равновесия или в неравновесном, кинетически лабильном состоянии.* Это верно для многих многокомпонентных пищевых продуктов, поскольку большинство из них содержат аморфное твердое вещество и перенасыщенные жидкие области. Как правило, частично аморфны биополимеры. Многие небольшие молекулы трудно кристаллизуются из раствора, и потому при перенасыщении они существуют в аморфном состоянии. Такое аморфное состояние может быть кинетически ограниченным (и потому метастабильным) или может медленно изменяться со временем (и потому будет неравновесным). По существу, нижняя линия раздела в диаграмме состояний (T_g) определяет предельные условия для метастабильной аморфной фазы, а область $C > C_E$ выше T_g и ниже T_m^S представляет неравновесное аморфное состояние с верхней границей этого состояния, определяемой линией растворимости (T_m^S), выше которой существует простой раствор. Отметим, что часть T_m^L слева от точки E ($C > C_E$) на рис. 2.23 определяет верхний предел неравновесного аморфного состояния для составов, в которых не присутствует из-за быстрого охлаждения или других ограничений. Так как в пищевых продуктах предотвратить кристаллизацию льда значительно труднее, чем кристаллизацию растворенного вещества, аморфное состояние для составов слева от точки E достигается с трудом, за исключением области начального переохлаждения перед начальной нуклеацией льда и области с C^L меньшей, но близкой к C_m^L, как определено ликвидусом, представляющим незамороженную фазу, которую можно назвать немаксимально концентрированным замораживанием матриксом. Основная цель ученых и технологов-пищевиков заключается в максимальном повышении желательных показателей пищевого продукта, зависящих от метастабильных равновесных состояний, и нахождении условий, обеспечивающих приемлемую стабильность тех желательных показателей, которые зависят от сохранения неравновесных состояний.

Еще одним важнейшим моментом, о котором необходимо снова сказать, являются скорости большинства физических, а также многих химических процессов, определяемые молекулярной подвижностью, так как для их завершения требуется некоторая форма движения молекул. Поскольку большинство пищевых продуктов существуют в метастабильных или неравновесных состояниях, зачастую наиболее адекватны кинетические подходы к пониманию, прогнозированию и контролю их свойств. Подходящий кинетический подход обеспечивает именно молекулярная подвижность, поскольку она причинно связана со скоростями лимитированных диффузией процессов в пищевых продуктах. Использование уравнения ВЛФ для получения оценочных значений *Mm* при температурах выше температуры стеклования T_g, но ниже T_m^L стало в последние десятилетия стандартной процедурой. Диаграммы состояний полезны для определения тех областей температуры и состава, которые позволяют метастабильным или неравновесным условиям существовать в течение нужных периодов времени. В случае замороженных систем определенные разногласия были связаны с выбором той T_g, которую следует использовать в уравнении ВЛФ. Как мы уже отмечали, хотя Левин и Слейд рекомендовали использовать T_m' (T_g' в их терминологии), очевидно, что в этом случае не учитывается разбавление незамороженной фазы вследствие плавления (таяния) при более высокой температуре; при этом также не признается, что истинной температурой стеклования максимально концентрированного замораживанием матрикса является T_g'. По-видимому, как было предложено в работах [74, 78, 79], правильнее использовать T_g, температуру стеклования для этой более разбавленной фазы. Тем не менее, учитывая отсутствие универсальных значений для параметров уравнения ВЛФ, оказывается, что использование любой договоренности для реальных систем эффективно в равной степени [79]. Поскольку основная проблема — это установление истинного значения T_g, несомненной удачей является достаточная точность оценок значения T_m' при его использовании в уравнении ВЛФ.

2.10.7. Ограничения данной концепции

Хотя подход, основанный на молекулярной подвижности, полезен для прогнозирования многих типов физических изменений, его полезность отнюдь не универсальна. Примерами реакций, для которых он не применим, могут служить химические реакции, скорости которых мало зависят от диффузии, эффекты,

обусловленные определенными химическими веществами, и ситуации, когда оцениваемая *Mm* отражает свойства полимерного компонента, тогда как в интересующем нас процессе задействованы небольшие молекулы, на подвижность которых потеря подвижности молекул в основном матриксе влияет слабо. Кроме того, для оценки роста вегетативных клеток микроорганизмов более хорошим прогнозным показателем служит подвижность молекул воды и, следовательно, значение $(p/p^0)_T$.

Возвращаясь к кинетике реакций, можно отметить, что в последние 20 лет велась активная дискуссия относительно того, какое из двух уравнений (уравнение ВЛФ или уравнение Аррениуса) дает лучшее описание температурной зависимости кинетики реакций в водных пищевых системах, особенно при температурах между T_g и T_m^L или T_m^S. Рассмотрим системы, которые могут образовать лед. В этой области при принятии *Mm*-подхода на подвижность молекул влияют два фактора (температура и концентрация). При снижении температуры концентрация возрастает. Сначала основное воздействие на подвижность молекул оказывает температура, но по мере ее снижения все более важным фактором становится возрастающая концентрация, так как образуется все больше льда. Влияние температуры и концентрации по отдельности на вязкость и подвижность молекул показано на рис. 2.25, а их совместное влияние — на рис. 2.26 и 2.27. Уравнение Аррениуса и уравнение ВЛФ правильно описывают влияние температуры на кинетику реакций, но только при условии постоянства концентрации. Влияние концентрации на кинетику вносит в анализ еще один фактор. Для реакции первого порядка концентрация не влияет на дробную скорость реакции (т. е., $t_{1/2}$ не зависит от концентрации), но для реакций более высоких порядков относительная их скорость зависит от концентрации. Для многих реакций в замороженных системах адекватно описание псевдопервого порядка, но это не гарантирует, что влияние концентрации можно игнорировать при оценке степени завершенности реакции, особенно в концентрированной замораживанием зоне. Как мы уже отмечали, экспериментальные данные свидетельствуют, что уравнение ВЛФ может давать адекватные оценки скорости и степени завершенности реакции как функции температуры и времени при использовании в качестве опорной температуры T_m' T_g' или T_g гомогенного стеклоподобного вещества с составом C_T^L (где T — необходимая температура хранения). Учитывая ограниченный диапазон температур в области между T_g и E_m^L для замороженных систем, не удивительно, что уравнение Аррениуса также обеспечивает удовлетворительное соответствие экспериментальным данным.

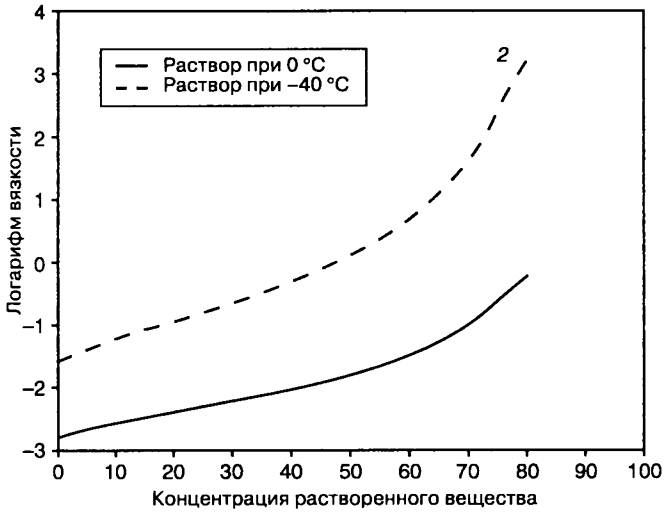


Рис. 2.25. Сравнительное влияние концентрации на вязкость водных растворов при температурах 0 °C (1) и –40 °C (2)

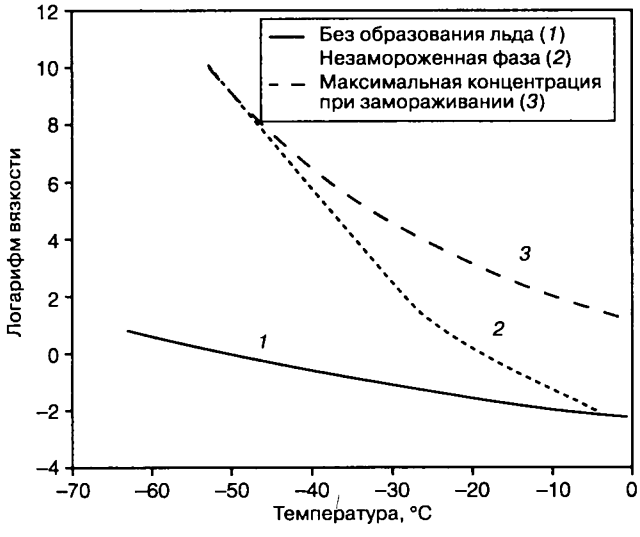


Рис. 2.26. Прогнозируемая вязкость водных систем как функция температуры: *1* — без образования льда при охлаждении; *2* — при таком образовании льда, что концентрация жидкой фазы следует за линией T_m^L; *3* — концентрация системы составляет C_0^*

Отметим еще один мало обсуждаемый фактор — это «эквимолярный» характер незамороженной фазы в замороженных системах. Присутствие льда определяет осмоляльность незамороженной фазы, исходя из допущения, что T_m' определяет концентрацию. Если состав (и, следовательно, моляльные соотношения) растворенных веществ меняется в результате реакций, то, в отличие от незамороженной системы, количество льда и, следовательно, индивидуальные концентрации для поддержания определенной осмоляльности незамороженной фазы будут корректироваться. Тем самым изменения концентраций реагента и продуктов реакции зависят от стехиометрии реакции по иному, чем в незамороженной системе.

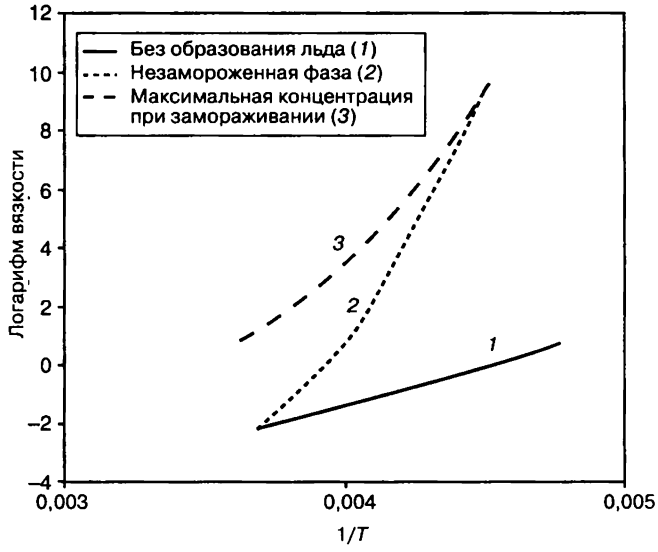


Рис. 2.27. Графики для данных, приведенных на рис. 2.26, относительно $1/T$

В системе с концентрацией реагента, приводящей к превышению T_g', где кристаллизация льда невозможна (в жидкой системе выше T_m^S), действует кинетика Аррениуса. Для графика Аррениуса в диапазоне температур, включая T_m^S, весьма нетипично, что его наклон вблизи T_m^S меняется. В интервале между T_m^S и T_g система может считаться резиноподобной. Особо следует отметить, что здесь наблюдается резкое уменьшение подвижности молекул при снижении температуры, что отражается в быстром изменении скорости реакций. Хотя для этой области трудно найти унифицированный подход, отмечается, что скорости многих физических событий лучше согласуются с уравнением ВЛФ, чем с уравнением Аррениуса. Зависимость химических реакций от молекулярной подвижности во многом определяется типом реакции, причем и кинетика ВЛФ, и кинетика Аррениуса не описывают все реакции в этой зоне. Следует отметить, что это рассуждение не относится к замороженным пищевым продуктам (концентрации меньше C_g'), поскольку оно не объясняет влияние возрастающей концентрации незамороженной фазы с увеличением содержания льда на свойства незамороженного матрикса, отраженные на рис. 2.26 и 2.27.

2.10.8. Практическое применение

2.10.8.1. Построение диаграммы состояний

Рассмотрев в некоторых деталях применимость диаграммы состояний и уравнения ВЛФ для понимания стабильности продукта, настало время более подробно обсудить трудности, связанные с определением диаграммы состояний и с применением уравнения ВЛФ. Диаграмма состояний создается с помощью инструментальных средств путем определения температур «изменения» конкретных систем в широком диапазоне концентраций. Здесь полезны ДСК-методы и метод *DMTA* (*Dynamic Mechanical Thermal Analysis*), но они требуют специальной аппаратуры и нуждаются в правильной интерпретации результатов. В любом случае отклик инструментального средства наносится на график как функция температуры, и отмечаются температуры, при которых происходят нарушения в ходе реакции. Несмотря на то что для многих систем можно получить оценку T_m' путем определении ДСК-кривой плавления для замороженных растворов с общей концентрацией растворенного вещества 20% и 80% воды. По таким данным трудно определить концентрацию максимально концентрированной замораживанием фазы, а также точно определить T_m'. Что касается трудности определения T_m', то лучше изучить исходные растворы в некотором диапазоне концентраций, поскольку таким способом можно минимизировать влияние инструментальных артефактов, а также медленной кристаллизации. Полезно и цикличное изменение температуры, так как циклические температуры выше и ниже T_g', а также около T_m' помогают приблизиться к образованию максимального количества льда в циклах охлаждения. Получение состоятельного значения для T_m' в некотором диапазоне

исходных концентраций раствора позволяет установить уровень достоверности этого значения. Еще большие трудности представляет оценка C^*. Подход, первоначально применявшейся Левиным и Слейдом, заключался в оценке количества льда, присутствующего в системе после образования максимально концентрированного замораживанием стеклоподобного вещества. К сожалению, их первоначальный метод оценки содержания льда имел серьезный дефект. При использовании растворов с начальной 20%-ной концентрацией растворенного вещества содержание льда определялось по площади пика, соответствующего таянию льда в термограмме нагревания. При этом в расчетах использовалось значение энтальпии плавления льда при 0 °С. Вместе с тем, энтальпия плавления льда зависит от температуры и со снижением температуры уменьшается, то есть этот метод приводит к недооценке количества льда и потому — к заниженному значению C_g^*. Были предложены улучшенные способы оценки содержания льда, учитывающие температурную зависимость энтальпии плавления, и высказано предположение, что методы с использованием нескольких исходных концентраций раствора более надежны (согласие данных, полученных для образцов с разными начальными концентрациями, обеспечивает большее доверие к надежности оценки T_m' [72, 80–82]). Как и в случае T_m', применение методики цикличного изменения температуры перед используемым для оценки содержания льда окончательным нагреванием дает более близкое приближение системы к состоянию с максимальным количеством концентрированного замораживанием стеклоподобного вещества, и потому к лучшей оценке $C_g^{*\prime}$ Определение T_g для стеклоподобного вещества при определенном составе исходного раствора представляет собой еще более трудную проблему, чем определение T_m'. Как мы уже отмечали, даже при использовании ускоренного охлаждения очень трудно (за исключением начальных концентраций вблизи $C_g^{*\prime}$) предотвратить кристаллизацию всего льда. Зачастую приходится оценивать, а не измерять T_g для конкретной концентрации растворенного вещества. Для этой цели используют различные уравнения. Старейшим и простейшим из них является уравнение Гордона–Тейлора, которое для двухкомпонентной системы имеет следующий вид:

$$T_g = \frac{w_1 T_{g1} + k w_2 T_{g2}}{w_1 + k w_2}, \tag{2.11}$$

где w_1 — массовая доля компонента 1; w_2 — массовая доля компонента 2; T_{g1} — температура стеклования для чистого компонента 1; T_{g2} — температура стеклования для чистого компонента 2; k — константа.

Первые работы по применению подхода, основанного на молекулярной подвижности, к стабильности пищевых продуктов были сосредоточены в основном на понимании поведения преимущественно углеводных систем. При рассмотрении поведения углеводов, которые являются основными компонентами пищевых продуктов, было сделано много важных выводов. Опытным путем было установлено, что для замороженных систем значение T_m' существенно зависит от молекулярной массы растворенного вещества, и с увеличением молекулярной массы это значение возрастает. Значительно меньше влияние молекулярных характеристик сахаров с той же молекулярной массой. Из графика T_m' относительно молекулярной массы сахаров, гликозидов и полиолов (рис. 2.28) следует, что T_m' возрастает пропорционально увеличению молекулярной массы растворенного вещества. Этого можно было ожидать, так как поступательная подвижность молекул снижается с увеличением их размера, и для движения крупной молекулы требуется более высокая температура, чем для небольшой. При молекулярных массах выше 3000 значение T_m', по-видимому, становится независимым от молекулярной массы

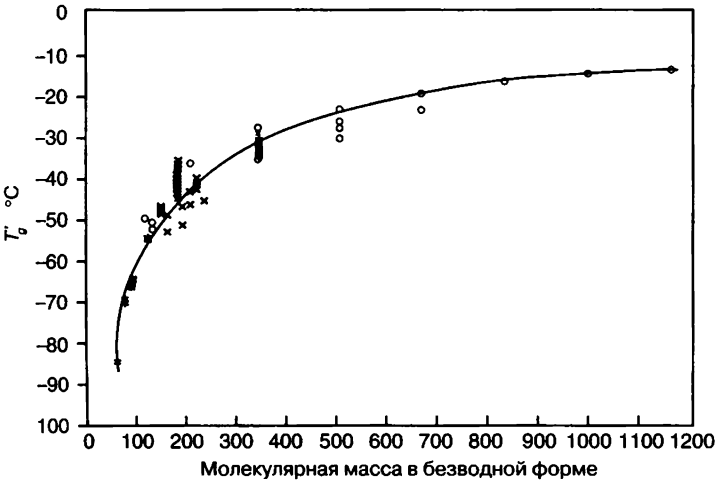


Рис. 2.28. Влияние молекулярной массы растворенного вещества на T_g (T_m') в растворах сахара (о), гликозида (×) и полиола (*)

Таблица 2.6

Значения температуры стеклования и обусловленные ею свойства чистых углеводов. По [64, 65]

Углевод	Молекулярная масса	Свойства в безводном состоянии			Свойства в гидратированном состоянии, T_m'
		T_m, K	T_g, K	T_m/T_g	
Глицерин	92,1	291	180	1,62	208
Ксилоза	150,1	426	282–287	1,49	225
Рибоза	150,1	360	260–263	137	226
Глюкоза	180,2	431	304–312	1,39	230
Фруктоза	180,2	397	280–290	1,39	231
Галактоза	180,2	443	303–305	1,45	232
Сорбит	182,2	384	269–271	1,45	229
Сахароза	342,3	465	325–343	1,40	241
Мальтоза	342,3	402	316–368	1,19	243
Трегалоза	342,3	476	350–352	1,35	243
Лактоза	342,3	487	374	1,37	245
Мальтотриоза	504,5	407	349	1,17	250
Мальтопентоза	828,9		398–438		257
Мальтогексоза	990,9		407–448		259
Мальтогептоза	1153,0		412		260

(рис. 2.29). Некоторые данные для сахаров, собранные Левином и Слейдом, приведены в табл. 2.6. В литературе имеются также данные для сахаров в безводной форме. При сборе таких данных требуется особое внимание, так как даже незначительные следы влаги могут существенно снизить T_g из-за пластификации. При условии приемлемого содержания влаги значения T_g сахаров в безводной форме зависят от молекулярной массы, а также от типа конкретного сахара.

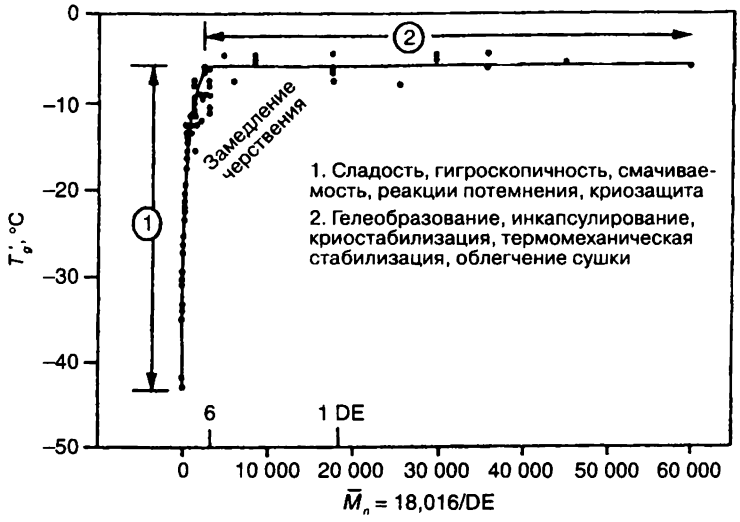


Рис. 2.29. Влиянии на T_g' значения декстрозного эквивалента (ДЭ, DE) и средней молекулярной массы промышленных продуктов гидролиза крахмала

Концентрация максимально концентрированного замораживанием матрикса (C_g^*) зависит в некоторой степени от размера молекул, но точное его измерение может стать очень трудной проблемой. Предполагая, что важным фактором является молекулярная подвижность, различия в T_m' и особенно в C_g^* для молекул с одинаковой молекулярной массой могут привести к очень разным последствиям для стабильности продукта. Этим предположительно объясняется различная эффективность глюкозы по сравнении фруктозой и лактозы по сравнению с трегалозой как стабилизирующих сахаров.

2.10.8.2. Процесс замораживания и замороженные пищевые продукты

Хранение в замороженном состоянии признано одним из лучших методов долговременного хранения пищевых продуктов. Основным фактором, обеспечивающим долговременную стабильность продуктов, является низкая температура, поскольку, как подчеркивалось ранее, скорости реакций имеют тенденцию

уменьшаться со снижением температуры. Образование льда в замороженных пищевых продуктах — своего рода обоюдоострый меч. Образование льда в клеточных пищевых продуктах и гелях приводит к двум важным неблагоприятным последствиям. Во-первых, увеличивается концентрация неводных компонентов в незамороженной фазе, а во-вторых, происходит увеличение объема примерно на 9%, обусловленное превращением жидкой воды в лед.

В ходе замораживания вода преобразуется в лед высокой чистоты. Следовательно, растворенные в водной фазе вещества сосуществуют с уменьшающимся количеством воды-растворителя. Этот процесс напоминает обычное обезвоживание (за исключением более низкой температуры), но отделившаяся вода остается в том же локальном окружении в форме льда, а не удаляется из него физически. Состав незамороженной фазы при любой температуре приближается к составу, который определяется соответствующими диаграммами состояний.

В ходе концентрирования замораживанием свойства (значение pH, титруемая кислотность, ионная сила и т. д.) незамороженной фазы существенно меняются. Если растворенные вещества кристаллизуются, то соотношения растворенных веществ изменятся, и значение pH может заметно сместиться. Кроме того, могут удаляться растворенные газы. При более высоких концентрациях вследствие замораживания макромолекулы могут агрегироваться из-за их вынужденного сближения. Мы уже отмечали, что хотя влияние температуры само по себе должно уменьшать скорости реакций, суммарные их скорости, особенно при высоких температурах ниже точки замерзания, могут увеличиваться или снижаться в меньшей степени, чем это ожидается для повышенных концентраций реагента вследствие концентрирования замораживанием. Это может происходить даже при том условии, что общее количество реагента в конкретном образце остается неизменным и совпадает с исходным количеством. В таких сложных условиях не удивительно, что скорости реакций при температурах ниже точки замерзания не всегда соответствуют кинетике Аррениуса или ВЛФ. При низких температурах ниже точки замерзания более высокие концентрации вследствие концентрирования замораживанием и близости к T_m' обычно приводят к снижению скоростей реакций и увеличению срока хранения.

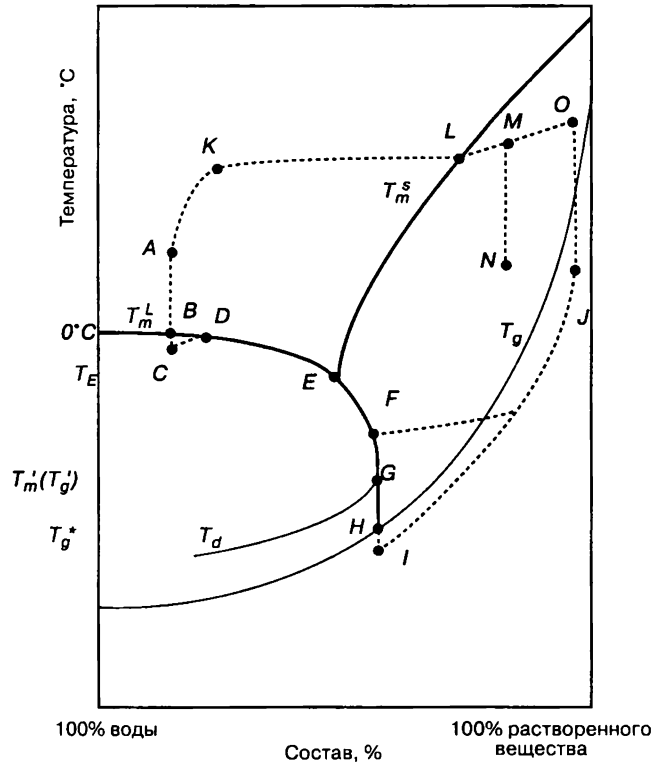


Рис. 2.30. Диаграмма состояний двухкомпонентной системы с указанием возможных путей для замораживания (нестабильная последовательность *ABCDEF*; стабильная последовательность *ABCDEFGHI*), сушки (нестабильная последовательность *AKLMN*; стабильная последовательность *AKLMOJ*) и сублимационной сушки (нестабильная последовательность *ABCDEFJ*; стабильная последовательность *ABCDEFGHIJ*). Для облегчения ввода данных используется схематическая шкала температуры

Полезно проанализировать процесс замораживания пищевых продуктов более подробно с помощью соответствующих диаграмм состояний. Рассмотрим сначала медленное замораживание многокомпонентного пищевого продукта. Такое медленное замораживание обеспечивает близкое соответствие равновесному состоянию «жидкость–твердое вещество» и близкое приближение к максимальному концентрированию замораживанием. Начиная с точки *A* на рис. 2.30, удаление явной теплоты переводит продукт в точку *B*, начальную равновесную точку замерзания образца. Поскольку нуклеация льда — это трудный процесс, дальнейший удаление теплоты приводит вместо замораживания к переохлаждению до тех пор, пока не будет достигнута точка *C*, в которой начинается нуклеация. Рост кри-

сталлов сразу после нуклеации высвобождает скрытую теплоту кристаллизации и вызывает повышение температуры до значения *D*. Дальнейшее удаление теплоты вызывает дополнительное образование льда, и концентрация незамороженной фазы следует вдоль линии T_m^L от *D* до *E* при T_E. В многокомпонентном пищевом продукте T_E представляет T_{Emax} для растворенного вещества с наибольшей эвтектической точкой (то есть, с наименьшей растворимостью). Растворенные вещества в таких многокомпонентных замороженных пищевых продуктах редко кристаллизуются при температурах, равных или ниже их эвтектических точек. Редкое исключение — это кристаллизация лактозы в некоторых замороженных молочных десертах, которая приводит к дефекту текстуры, называемому «песчанистостью».

Если не образуются эвтектического состояния, то дальнейшее образование льда приводит к метастабильному перенасыщению многих растворенных веществ, и состав следует за линией от точки *E* до точки *F*, рекомендуемой температуры хранения. Для большинства пищевых продуктов *F* выше T_m', а это означает, что молекулярная мобильность все еще весьма высока, а лимитированные диффузией физические и химические свойства пищевых продуктов по-прежнему сильно зависят от температуры. Опытным путем было установлено, что скорость изменений пропорциональна разности температур ($T - T_m'$) при величине этой разности в пределах 20 °С.

Если охлаждение продолжается после точки *F*, то происходит дополнительное образование льда и концентрирование замораживанием, пока концентрация не достигнет значения, близкого к точке T_m' (точка *G*). Дальнейшее охлаждение не вызывает дополнительного образования льда, и при температуре T^* (точка *H*) перенасыщенная незамороженная фаза переходит в стеклообразное состояние с внедренными кристаллами льда, образовавшимися в ходе процесса охлаждения. T_g' — это квазиинвариантная T_g максимально концентрированного замораживанием незамороженного матрикса, которая зависит от соотношения в образце растворенных веществ, а не от их исходных концентраций. Максимальное концентрирование замораживанием редко происходит в начале цикла охлаждения. Следовательно, наблюдаемая T_m' зависит не только от соотношения растворенных веществ, но и в некоторой степени от исходного содержания влаги в образце, поскольку достижение максимального концентрирования замораживанием зависит от ряда кинетических факторов. Соответствующее цикличное изменение температуры вблизи T_m' обычно обеспечивает более близкое приближение к C_g' и, следовательно, наименьшую измеренную T_m'

Здесь важно отметить, что отсутствие кристаллизации льда не является следствием пониженной подвижности молекул воды. Молекулы воды остаются мобильными, и они свободно обмениваются. Лимитирующим процессом в этом случае является неспособность молекул растворенного вещества перемещаться или вращаться в данном масштабе времени, благодаря чему предотвращается добавление дополнительных молекул воды к уже существующему льду. В этой ситуации (быстрого замораживания) продолжается взаимообмен молекулами воды вне льда и на его поверхности.

Поскольку T_m' представляет температуру, ниже которой удаление льда из матрикса (при охлаждении) или растворение льда в нем (при нагревании) впервые становится возможным во временно́м масштабе наших измерений, она определяет температуру, при которой во время охлаждения подвижность молекул существенно снижается, и лимитированные диффузией свойства проявляют высокую стабильность. Некоторые значения T_m' для различных материалов приведены в табл. 2.6–2.9. Возникает вопрос, что будет происходить при использовании более высоких скоростей охлаждения. Влияние повышенной скорости охлаждения показано на рис. 2.31. Первоначально после некоторого переохлаждения незамороженная фаза, как и можно было ожидать, следует за линией T_m^L. По мере снижения температуры и увеличения концентрации незамороженной фазы подвижность молекул растворенных веществ уменьшается. Время, требуемое для образования кластеров чистой воды и одновременного удаления растворенного вещества из объема, занимаемого водой, может превысить допустимые пределы. Следовательно, льда образуется меньше, чем требуется линией T_m^L, и концентрация незамороженной жидкой фазы C_m^L при температуре *T* меньше, чем прогнозируется линией T_m^L. Так как скрытая теплота, связанная с образованием этого «отсутствующего» фронта льда, не высвобождается, при дальнейшем удалении теплоты скорость понижения температуры увеличивается, уменьшая подвижность молекул и приводя ко все большему и большему отклонению C_m^L от значения, определенного линией T_m^L. Отклонения C_m^L от линии T_m^L с повышением скорости охлаждения и снижением температуры возрастают.

Таблица 2.7

Значения T_m' и ДЭ некоторых промышленных продуктов гидролиза крахмала. По [64]

Продукты гидролиза крахмала	Производитель	Источник получения	ДЭ	T_m', К
Staley 300	*Staley*[a]	Кукуруза	35	249
*Maltrin M*250	*GPC*[b]	Зубовидная кукуруза	25	255
*Maltrin M*150	*GPC*	Зубовидная кукуруза	15	259
Paselli SA–10	*Avebe*[c]	Картофель	10	263
Star Dri 5	*Staley*	Зубовидная кукуруза	5	265
Кристаллическая камедь	*National*[d]	Тапиока	5	267
Stadex 9	*Staley*	Зубовидная кукуруза	3,4	268
AB 7436	*Anheuser–Busch*	Восковая кукуруза	0,5	269

[a] *A.E. Staley manufacturing.*
[b] *Grain Processing Corporation.*
[c] *Avebe America.*
[d] *National Starch Corporation.*

Таблица 2.8

Значения T_m' для некоторых белков. По [112]

Белок	T_m', К	Белок	T_m', К
Бычий сывороточный альбумин	260	Желатин 300 (по Блуму)	263
Лизоцим	256	Желатин 250 (по Блуму)	262
α-Лактальбумин	262	Желатин 175 (по Блуму)	261
α-Казеин	260	Желатин 50 (по Блуму)	260
Казеинат натрия	263		

Таблица 2.9

Оценочные значения T_m' для некоторых пищевых продуктов

Пищевой продукт	T_m', К		Пищевой продукт	T_m', К	
	По Левину и Слейду[a]	По другим данным		По Левину и Слейду[a]	По другим данным
Молочные продукты:			Овощи:		
сыр коттедж	252		брокколи	246	252[d]
сыр чеддер	249		цветная капуста	248	253[d]
сливки	250		картофель	257–262	
мороженое	232–246		шпинат	256	239[d]
молоко обезжиренное	246	241[b]	сахарная кукуруза	259–265	
молоко цельное	251		помидоры	232	
Фрукты свежие:			Мясо и рыба:		
яблоки	231	245[d]	говядина		261[c],260[d]
бананы	238		свинина		257[d]
черника	232		куриное мясо		251[d]
персики	237	244[d]	мясо индейки		253[d]
земляника	232–239		треска		262[c], 256[d]
Соки фруктовые:			зубатка		256[d]
яблочный	233	243[d]	сайда		261[d]
лимонный	230		лосось		256[d]
апельсиновый	236	243[d]	креветки		241[d]
грушевый	233				
ананасовый	232	241[d]			

[a] [64, 115].
[b] [116].
[c] Неопубликованные данные Брейка (*Brake, N.*) и О. Феннема.
[d] Неопубликованные данные Сю (*Hsu, J.*) и Рейда (*D. Reid*).

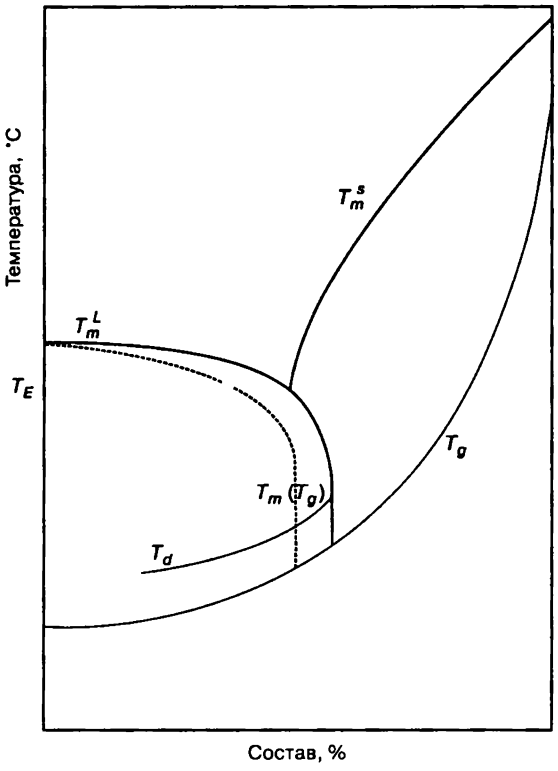


Рис. 2.31. Влияние ускоренного замораживания на состав и состояние незамороженной фазы

2.10.8.3. Процессы сушки

Диаграмму состояний (рис. 2.30) можно использовать также для иллюстрации хода многих других процессов, включая изменения состояния или количества влаги в системе. С ее помощью можно лучше оценить различия между воздушной (естественной) сушкой и сублимационной сушкой.

Рассмотрим сначала воздушную сушку при постоянной температуре. При воздушной сушке, начиная с точки *A*, будет повышаться температура и удаляться влага, пока продукт не достигает свойств, соответствующих точке *K* (температура воздуха по влажному термометру). Дальнейшее удаление влаги заставит продукт достичь и пройти точку *L* на кривой растворимости, в которой достигается состояние насыщения для доминирующего растворенного вещества (ДРВ). Кристаллизации сразу не происходит, и продукт становится перенасыщенным ДРВ и любым другим растворенным веществом с температурой насыщения выше, чем у ДРВ. Каждый из этих перенасыщенных растворов можно рассматривать как аморфную жидкую фазу. При дальнейшем удалении влаги система может пройти через точку *M*, соответствующую температуре воздуха по сухому термометру, и далее, до точки *O*. Охлаждение системы в точке *M* приводит к температуре *N*, которая находится выше кривой T_g, а охлаждение в точке *O* приводит к температуре *J*, которая находится ниже кривой T_g. Это означает, что сушку следует проводить после достижения температуры воздуха по сухому термометру (*M*), поскольку если сушка заканчивается в точке *M*, то продукт в точке *N*, находящейся выше T_g, будет иметь относительно высокую подвижность молекул и, следовательно, недостаточную стабильность свойств, лимитированных диффузией, которые существенно зависят от температуры (кинетика ВЛФ). Завершение сушки в точке *O* приведет к достижению точки *J*, находящейся ниже T_g, и продукт будет характеризоваться намного меньшей подвижностью молекул и стабильными свойствами со слабой зависимостью от температуры.

На этом рисунке показаны также пути сублимационной сушки продукта. Первая ее стадия довольно точно совпадает с путем для медленного замораживания (*ABCDEF*). Если в ходе основной сублимационной сушки температуре продукта не дать снизиться ниже температуры *F*, то типичен путь *FJ*. Начальные стадии пути *FJ* включают сублимацию льда. В некоторой точке с концентрацией, близкой к C'_g, сублимация льда будет полной, и наступает фаза десорбции. Так как температура образца выше кривой T_g, воз-

можен коллапс, особенно в продуктах, которые первоначально были жидкими, хотя в некоторой степени такая возможность существует и для продуктов из мышечных и растительных тканей. Коллапс обусловлен отсутствием льда, обеспечивающего структурную поддержку, а также тем, что температура продукта T выше T_g и он обладает достаточной подвижностью молекул, препятствующей жесткости. Такой коллапс приводит к тому, что качество продукта ухудшается, а меньшее количество пор в продукте обусловливает более медленную сушку и ухудшение характеристик регидратации. Для предотвращения коллапса сушка должна проходить по пути *ABCDEFGHIJ*, где участок *HI* соответствует охлаждению до температур ниже T'_g.

В случае максимальной кристаллизации льда (максимального концентрирования замораживанием) критическая температура для структурного коллапса (T_c — наибольшая температура, при которой коллапса можно избежать в течение основной стадии сублимационной сушки) будет находиться где-то между T'_m и T'_g. Точная температура будет зависеть от скорости сушки и, следовательно, интервала времени, в течение которого возможен коллапс. Чем медленнее процесс сушки, тем ниже будет значение T_c. Если кристаллизация льда не максимальна, то самая высокая температура, при которой коллапса можно избежать, будет приближаться к T_g.

Если состав сублимируемого продукта можно скорректировать, то желательно в максимально возможной степени повысить T'_m. Это достигается путем внесения в продукт высокомолекулярных полимеров, позволяющих использовать более высокие температуры сублимационной сушки. Улучшает структурную жесткость и минимизирует потенциальную степень коллапса также увеличение C^*, из-за чего возрастает количество образовавшегося льда.

2.11. Изотермы сорбции влаги

Подход, основанный на молекулярный подвижности, — отнюдь не единственный подход к пониманию стабильности пищевого продукта как функции содержания влаги. Учитывая возможность определения содержания влаги и *RVP*, полезно рассмотреть информацию, которую можно получить при анализе очевидной зависимости содержания влаги от *RVP*. Этот подход возник намного раньше подхода, основанного на анализе подвижности молекул.

2.11.1. Определения и зоны

График содержания влаги (выраженного в массе воды на единицу массы сухого материала) в пищевом продукте относительно $(p/p^0)_T$ известен как изотерма сорбции влаги (ИСВ). Информация, полученная на основе ИСВ, необходима:

- для изучения и контроля процессов концентрации и дегидратации, поскольку легкость или трудность удаления влаги связана с *RVP*;
- составления рецептур пищевых смесей, позволяющих избежать миграции влаги между ингредиентами;
- определения влагоизолирующих свойств упаковочных материалов, необходимых для защиты конкретной пищевой системы;
- определения содержания влаги, замедляющего рост микроорганизмов в системе;
- прогнозирования химической и физической стабильности пищевых продуктов как функции изменения содержания влаги.

Приведенная на рис. 2.32 ИСВ для пищевого продукта с высоким содержанием влаги охватывает весь диапазон содержания влаги. Этот тип графика не очень полезен, поскольку данные, представляющие наибольший интерес, а именно данные для области низкого содержания влаги, детализируется недостаточно. Обычно отказываются от области высокого содержания влаги и расширяют область низкого, что позволяет получить значительно более полезную ИСВ (рис. 2.33).

Изотермы сорбции влаги имеют множество форм, многие из которых поддаются довольно качественной интерпретации. В качестве примера на рис. 2.34 приведены ИСВ для нескольких веществ, отличающиеся по своей форме. Эти изотермы ресорбции (или адсорбции) получены добавлением воды в ранее высушенные образцы. Распространены также изотермы десорбции. Соответствие адсорбционных

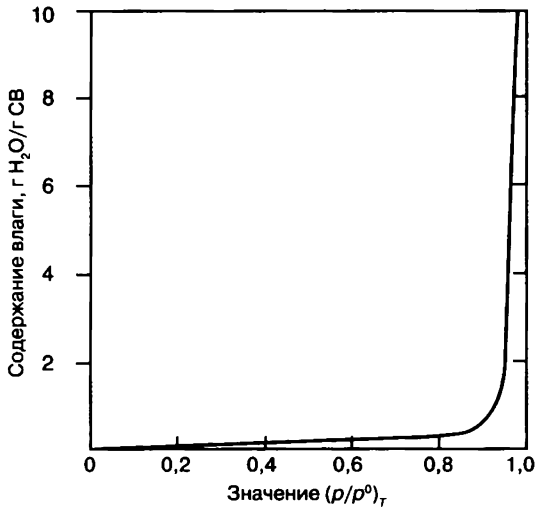


Рис. 2.32. Схематическая ИСВ, охватывающая широкий диапазон содержания влаги

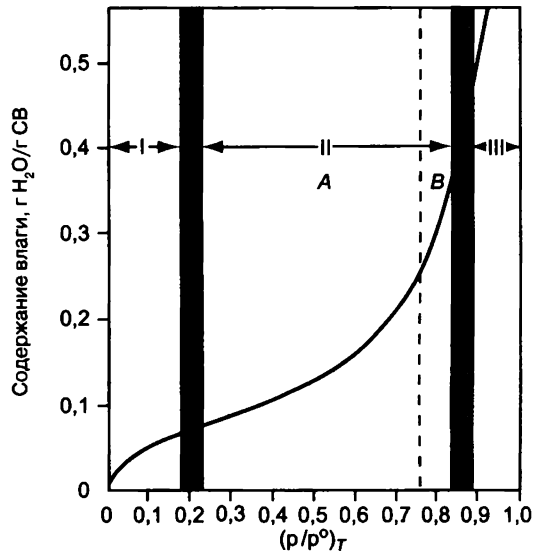


Рис. 2.33. Обобщенная ИСВ для диапазона низкого содержания влаги в пищевом продукте (при 20 °С)

и десорбционных изотерм мы рассмотрим далее в разделе 2.11.3. Для большинства пищевых продуктов характерны ИСВ сигмовидной формы. Вместе с тем многие пищевые продукты (например, фрукты, кондитерские изделия и экстракт кофе) с высоким содержанием сахара и других небольших растворимых молекул и с небольшим содержанием труднорастворимых гидрофильных полимеров могут иметь изотерму в форме буквы *J* (кривая *1* на рис. 2.34). Форма и положение изотерм определяются несколькими факторами, а именно составом образца (включая распределение молекулярных масс, гидрофильные и гидрофобные характеристики растворенных веществ), физической структурой образца (кристаллической или аморфной), его предварительной обработкой, температурой и принятыми методами измерений.

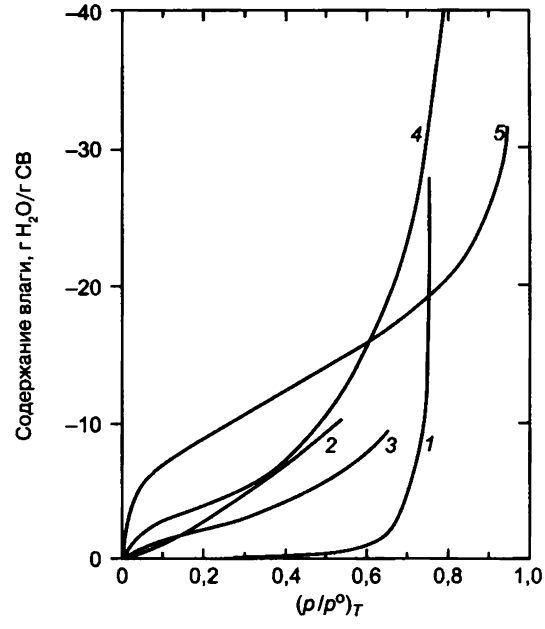


Рис. 2.34. Изотермы ресорбции для различных пищевых продуктов и биологических материалов при температуре 20 °С (за исключением кривой *1*, где температура 40 °С): *1* — кондитерское изделие (основной компонент — сахарная пудра); *2* — экстракт цикория распылительной сушки; *3* — колумбийский кофе после обжарки; *4* — сухой экстракт поджелудочной железы свиньи; *5* — нативный рисовый крахмал. По [40]

Предпринималось много попыток моделирования ИСВ, однако очень трудно было обеспечить хорошее соответствие моделей всем фактическим данным. Старейшая и наиболее известная модель — это модель Брунауера–Эмметта–Теллера (*Brunauer, Emmett, Teller*), полученная для сорбции неполярного газа [83]. Она известна как модель *BET* и применялась к водным системам с некоторым переопределением основных терминов. Одна из лучших моделей (известная как модель *GAB*), разработана Гугенхаймом (*Guggenheim*) [84], Андерсоном (*Anderson*) [85] и Дебоером (*De Boer*) [86]. При анализе пищевых систем следует иметь в виду, что обе эти модели, несмотря на всю их полезность, предусматривают по существу эмпирические подгонки, поскольку лежащие в их основе модели имеют параметры, описывающие значительно более простые системы. Для облегчения интерпретации ИСВ иногда полезно концептуально разделять их на зоны (см. рис. 2.33). При добавлении воды (ресорбции) состав образца постепенно перемещается из зоны I (малого содержания влаги) к зоне III (высокого содержания влаги), причем свойства воды в каждой зоне существенно отличаются. Эти характерные свойства описаны и просуммированы в табл. 2.10. Следует учитывать, что даже

Таблица 2.10
Уровни гидратации белка

Свойство	Увеличение содержания влаги в системе					
	Структурная вода[a]		Гидратная оболочка (≤3 Å от поверхности)		Вода объемной фазы	
					Свободная[b]	Захваченная[c]
Относительное давление водяного пара, p/p^0	<0,02 p/p^0	0,02–0,2 p/p^0	0,2–0,75 p/p^0	0,75–0,85 p/p^0	> 0,85 p/p^0	> 0,85 p/p^0
Изотермическая «зона»[d]	Крайняя левая часть зоны I	Зона I	Зона IIA	Зона IIB	Зона III	Зона III
H_2O/сухой белок, моль/моль	< 8	8–56	56–200	200–300	> 300	> 300
H_2O/сухой белок, г/г, (h)	<0,01	0,01–0,07	0,07–0,25	0,25–0,58	> 0,58	> 0,58
Процент масс. в пересчете на лизоцим, %	1	1–6,5	6,5–20	20–27,5	> 27,5	> 27,5
Характеристики воды: структура	Важнейшая часть структуры нативного белка	Вода взаимодействует в основном с заряженными группами (~2НОН/группа). При h = 0,07 происходит трансформация структуры поверхностной воды; появляются кластеры, ассоциируемые с завершением гидратации заряженных групп	Вода взаимодействует в основном с полярными поверхностными группами (~1 НОН/полярная группа). Кластеры воды сосредоточиваются на заряженных полярных участках. Размер и расположение кластеров варьируют. При h = 0,15 достигается дальняя связность поверхностной воды	*При* h = 0,25 вода начинает конденсироваться на слабо взаимодействующих незаполненных участках поверхности белка. При h = 0,38 «монослой» воды покрывает всю поверхность белка. Начинает появляться отчетливая водная фаза и участок перехода из стеклообразного в резиноподобное состояние		
Характеристики воды: термодинамические свойства подвижности[e]						
$i\Delta G$ (кДж/моль)	> |–6|	–6	–0,8	Близкое к значению для объемной воды		
$i\Delta H$ (кДж/моль)	> |–17|	–70	–2,1	То же		

Время пребывания (примерно соответствует подвижности)	10^{-2}–10^{-8} с	<10–8 с	$<10^{-9}$ с	10^{-9}–10^{-11} с	10^{-11}–10^{-12} с	10^{-11}–10^{-12} с
Способность к замерзанию	Незамерзающая	Незамерзающая	Незамерзающая	Незамерзающая	Нормальная	Нормальная
Растворяющая способность	Отсутствует	Отсутствует	Слабая	Умеренная	То же	То же
Характеристики белка: структура	Скрученное стабильное состояние	Аморфные области начинают пластифицироваться водой	Наблюдается дальнейшая пластификация аморфных областей			
Характеристики белка: подвижность (сказывающаяся на ферментативной активности)	Ферментативная активность пренебрежимо мала	Ферментативная активность пренебрежимо мала	Обмен протонов при $h = 0{,}04$ увеличивается с 1/1000 до максимальной скорости при $h = 0{,}15$. У некоторых ферментов при h 0,1...0,15 проявляется активность	При $h = 0{,}38$ активность лизоцима составляет 0,1 активности в разбавленном растворе	Максимальная активность	Максимальная активность

[a] Молекулы воды, занимающие определенные положения внутри макромолекулы растворенного вещества.

[b] Макроскопическая текучесть, физически неограниченная макромолекулярным матриксом.

[c] Макроскопическая текучесть, физически ограниченная макромолекулярной матрицей.

[d] См. рис. 2.33.

[e] Частичные молярные значения для перемещения воды из объемной фазы в гидратную оболочку.

Примечание. Предполагается, что в начале процесса гидратации структурная вода присутствует в сухом белке. Вода сначала абсорбируется участками ионизированных карбоксильных и аминных боковых цепей, причем таким образом связывается около 40 молей воды/моль лизоцима. Дальнейшая абсорбция воды приводит к постепенной гидратации менее притягивающих воду участков, в основном карбонильных групп амидов белкового каркаса. При h = 0,38 достигается покрытие монослоем благодаря воде, связывающейся с еще менее притягивающими воду участками поверхности. На этой стадии гидратации белка имеется в среднем 1 HOH/20 Å^2 поверхности белка. При содержании влаги более 0,58 *h* белок считают полностью гидратированным.

Данные (прежде всего по лизоциму) приводятся в основном по работам [30, 39, 100, 113, 114].

в пределах одной зоны молекулы воды способны к свободному обмену, и таким образом средние свойства воды в данной зоне зависят от точной степени заполнения ее молекулами свободных мест в пределах данной зоны. Свойства воды в различных зонах, тем не менее, достаточно отличаются, так что к началу заполнения более высокой зоны (даже в условиях легкого обмена воды между зонами) можно различить отчетливые совокупности молекул воды («пулы») с различными средними свойствами, соответствующими разным зонам.

Воду, присутствующую в количествах, не превышающих границы зоны I, можно считать наиболее сильно сорбированной и наименее подвижной. Эта вода, возможно, связана с доступными полярными участками водно-ионными или водно-дипольными взаимодействиями. Она остается незамерзающей при –40 °С, не работает как растворитель и не присутствует в достаточном количестве, чтобы оказывать пластифицирующее действие на твердое вещество. Такая вода ведет себя просто как часть твердого вещества.

Конец зоны I с высоким содержанием влаги (граница зон I и II) соответствует «*BET*-монослойному» содержанию влаги в пищевом продукте. Таким образом, значение *BET*-монослоя можно считать примерно соответствующим количеству воды, необходимому для образования монослоя только над легко доступными, очень полярными группами сухого вещества. Для крахмала оно составляет одну молекулу НОН на ангидроглюкозный остаток. Количество воды зоны I соответствует лишь малой доле общего содержания влаги в пищевом материале с высоким ее содержанием и явно меньше потенциальных «участков сорбции», представленных всеми полярными или другими активными группами молекул растворенного вещества. Можно считать, что дополнительная вода, добавляемая в количестве, не превышающем предела, установленного границей зоны II, заполняет те места первого слоя, которые все еще остаются доступными. Этот второй«пул» воды, возможно связанный с соседними молекулами воды первого слоя и молекулами растворенного вещества в основном водородными связями, немного менее подвижна, чем объемная вода, и большая часть ее остается незамерзающей при – 40 °С. Влага, добавляемая вблизи конца зоны II с низким содержанием влаги, оказывает на растворенные вещества значительное пластифицирующее действие, понижает их температуры стеклования и вызывает начальное набухание твердого матрикса. Взаимообмен всех молекул воды увеличивается, но в релаксационно-спектроскопических экспериментах эти два «пула» становятся обнаруживаемыми. Это действие вместе с началом процесса растворения приводит к увеличению скорости большинства реакций вследствие возрастающего взаимодействия и доступности. Количество воды, которая полностью занимает зоны I и II, в пищевом материале с высоким содержанием влаги обычно составляет менее 5%. Следует отметить, что отдельные зоны определяются только для значений содержания влаги ниже значений их верхних зональных границ, так как при этих концентрациях начинает появляться новый «пул» воды. Это инициирует процессы обмена, которые при более высоких содержаниях влаги позволяют отдельными «пулами» обмениваться молекулами воды. Кроме того, это является следствием влияния более набухшей среды (с более высоким содержанием влаги) на доступ к потенциально взаимодействующим участкам, которые на ранних стадиях сорбции были пространственно или иным способом отделены от полной «сухости». Несмотря на это, такие взаимообменивающиеся, идентифицируемые фракции воды можно рассматривать как имеющие общие характеристики зоны I или зоны II. Количественное определение таких «зональных пулов» представляет значительные трудности, причем наилучшие оценки дает релаксационная спектроскопия. В работе [87] было показано, что релаксационная спектроскопия пищевых продуктов дает возможность получить сложную кривую затухания, которая можно интерпретировать в терминах «пулов» воды и обмена ею между пулами. В работах [88–91] этот подход был расширен и использован для количественного определения и описания изменяющихся пулов воды в различных пищевых продуктах и модельных системах, в частности крахмалосодержащих. Подробный анализ этих исследований приведен в работе [4]. Их результаты свидетельствуют о большей сложности происходящих явлений, чем в простой трехзонной модели, но подтверждают, что эта модель дает простую основу для интерпретации изотерм сорбции влаги.

При дальнейшем увеличении содержания влаги вблизи соединения зон II и III ее количество становится достаточным для завершения построения полной монослойной гидратной оболочки отдельных макромолекул, например глобулярных белков, и для снижения температуры стеклования гидратированных макромолекул, так что температура образца и T_g выравниваются и появляется третий различимый «пул». Дальнейшее добавление воды (зона III) в образцах, содержащих стеклообразные области, вызывает

переход из стеклообразного состояния в резиноподобное, о чем свидетельствует существенное снижение вязкости из-за резкого увеличения молекулярной подвижности, сопровождаемого соразмерным увеличением скорости многих реакций. Добавленная вода может замерзать только при таком (или большем) содержании воды, при котором начинает появляться этот третий «пул». Кроме того, вода зоны III доступна как растворитель и поддерживает рост микроорганизмов. При содержании влаги выше нижней границы зоны III дополнительная вода ведет себя как вода объемной фазы (см. табл. 2.10). Ее добавление к системе не меняет свойства присутствующих растворенных веществ, хотя, как и прежде, все молекулы воды могут свободно обмениваться. Когда «пулы» молекул воды вовлекаются в определенные классы взаимодействий с растворенным веществом определяется меньшее количество зон. Релаксационно-спектроскопические исследования свидетельствуют, что с увеличением содержания влаги размер различных взаимобменивающихся «пулов» может меняться. Водная фракция, при которой новый «пул» только начинает появляться, необязательно определяет максимальный размер предшествующей пула при более высоком общем содержании влаги.

В гелях или клеточных системах вода объемной фазы физически захватывается (задерживается), так что макроскопическое ее течение затрудняется. Тем не менее, во всех других аспектах свойства этой воды сходны со свойствами воды в разбавленном солевом растворе, поскольку типичная молекула воды, находящаяся в зоне III, «изолируется» от влияний молекул растворенного вещества несколькими слоями молекул воды зон I и II. В пищевых продуктах с высоким содержанием влаги «пул» воды объемной фазы зоны III, захваченной или свободной, обычно составляет более 95% всей воды — факт, который из рис. 2.33 совсем не очевиден.

Важные влияния таких различий в свойствах воды на стабильность пищевых продуктов мы рассмотрим в следующих разделах. Здесь же достаточно сказать, что стабильность пищевого продукта зачастую определяется наиболее мобильной фракцией воды.

2.11.2. Температурная зависимость

Как мы уже отмечали, значение *RVP* зависит от температуры. Соответственно, изотермы сорбции влаги также должны зависеть от температуры. Пример такой температурной зависимости приведен на рис. 2.35. При любом заданном содержании влаги значение $(p/p^0)_T$ пищевого продукта возрастает с ростом температуры, зачастую в соответствии с уравнением Клаузиуса–Клапейрона, хотя это соответствие само по себе не свидетельствует о стабильном равновесии.

2.11.3. Гистерезис

Из вышеизложенного понятно, что для построения изотерм сорбции влаги можно использовать как адсорбционные, так десорбционные методы. Тем не менее, дополнительная сложность в нашем обсуждении изотерм сорбции влаги связана с тем, что такая изотерма, полученная добавлением воды (ресорбцией) в сухой образец, необязательно будет накладываться на изотерму, полученную десорбцией. Такое отсутствие совпадения называется «гистерезисом», схематический пример кото-

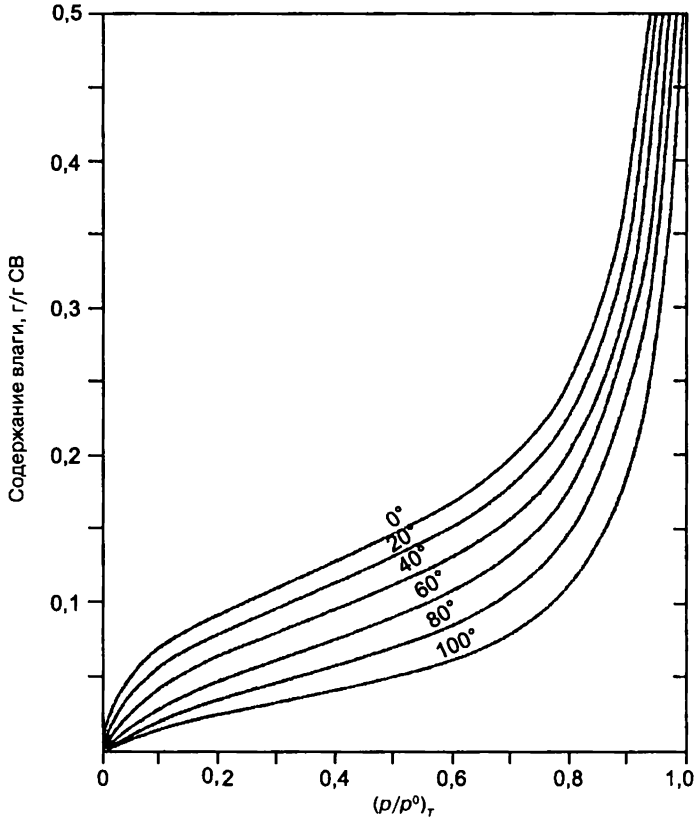


Рис. 2.35. Изотермы десорбции влаги для картофеля при различных температурах. По [109]

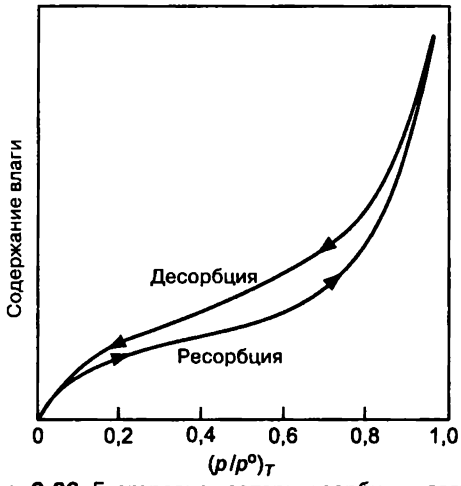


Рис. 2.36. Гистерезис изотермы сорбции влаги

рого показан на рис. 2.36. Как правило, при любом заданном $(p/p^0)_T$ содержание влаги в образце в ходе десорбции будет больше, чем в ходе ресорбции. Такой гистерезис сорбции наблюдается для изотерм сорбции влаги полимеров, стеклоподобных низкомолекулярных соединений и многих пищевых продуктов [52, 92].

Величина гистерезиса, форма кривых и точки начала и окончания петли гистерезиса могут меняться в зависимости от таких факторов, как тип пищевого продукта, физические изменения, которым он подвергается при удалении или добавлении воды, температура, скорость десорбции и степень удаления воды в ходе десорбции [92]. Влияние температуры ясно выражено: гистерезис зачастую не обнаруживается при высоких температурах (около 80 °С) и обычно проявляется при снижении температуры.

Для объяснения гистерезиса сорбции предложено несколько теорий [52, 92], основанных на таких факторах, как явления набухания, наличие метастабильных локальных областей, хемосорбция, фазовые превращения, капиллярные явления и повышение устойчивости неравновесных состояний со снижением температуры. Окончательное объяснение гистерезиса сорбции еще предстоит сформулировать.

Гистерезис сорбции представляет собой нечто большее, чем просто предмет любопытства аналитиков. В работе [93] было ясно продемонстрировано, что окисление липидов в курином или свином фарше при значениях $(p/p^0)_T$ в диапазоне 0,75–0,84 происходит значительно быстрее, если желаемое $((p/p^0)_T$ образцов достигается десорбцией, а не ресорбцией. Десорбционные образцы, как мы уже отмечали, содержат больше влаги при данном $(p/p^0)_T$, чем ресорбционные. Это приводит к тому, что образец с более высоким содержанием влаги (десорбционный) имеет более низкую вязкость, которая, в свою очередь, обусловливает более высокую каталитическую подвижность, бо́льшую доступность каталитических участков вследствие набухания матрикса и несколько бо́льшую диффузность кислорода, чем образец с меньшим содержанием влаги (ресорбционный). В другой работе [94] те же авторы обнаружили, что значение $(p/p^0)_T$, необходимое для остановки роста и размножения некоторых микроорганизмов, будет значительно ниже, если продукт приготавливается путем десорбции, а не ресорбции. Наличие гистерезиса — это дополнительное убедительное доказательство, что изотермы сорбции определяют стационарные системы (в предположении, что системе было предоставлено достаточно времени для достижения установившегося состояния), а не стабильно равновесные системы.

Совершенно ясно, что изотермы сорбции влаги являются существенно продукт-специфическими, что изотерма сорбции влаги для данного продукта может значительно меняться в зависимости от способа приготовления продукта, и что эти факторы имеют большое практическое значение. Дополнительная информация об измерении и полезности изотерм сорбции влаги приводится в работах [48, 95–98], а типичные изотермы сорбции влаги приведены в работе [99].

2.11.4. Последовательность гидратации белка

Довольно полезно рассмотреть дальнейшую абсорбцию воды сухим компонентом пищевого продукта, а также локализацию и свойства воды на каждой стадии этого процесса. Для примера мы будем использовать лизоцим (из-за важности белков в пищевых продуктах, а также потому, что в них содержатся все основные типы функциональных групп, важные для гидратации). Даже в «сухом» лизоциме содержится некоторое количество структурной воды (около 8 М воды/г сухого белка), которая является неотъемлемой частью структуры. При воздействии возрастающих уровней *RVP* вода сначала адсорбируется в участках ионизированных боковых цепей карбоновой кислоты и аминов. При значении *RVP* около 0,2 это требует около 40 М воды/М сухого лизоцима, что примерно соответствует содержанию воды в *BET*-монослое и соединению зон I и IIA. Дальнейшее увеличение *RVP* примерно до 0,25 (конец зоны IIA) приводит к сорбции в меньшем количестве активных центров (карбонильных групп амидов), а продолжение

сорбции до *RVP* 0,75 (конец зоны IIB) приводит к полному покрытию поверхности с содержанием влаги 0,38. В этой точке (соединение зон IIB и III) все подходящие участки поверхности считаются покрытыми [100]. При более высоких значениях *RVP* (зона III) состояние воды соответствует многослойной (объемной) воде. Ферментативная активность впервые становится заметной после покрытия «*BET*-монослоем», а максимальная активность достигается в точке полного покрытия поверхности. Эти результаты наблюдений помогают пояснить значение «зонального описания» изотермы сорбции влаги для классификации эффектов гидратации, но следует не забывать, что при любом конкретном содержании влаги происходит свободный обмен всех молекул воды между зонами, что с увеличением содержания влаги приводит к некоторому континууму способов поведения воды.

2.12. Относительное давление пара и стабильность пищевого продукта

В прошедшие годы многократно демонстрировалось, что стабильность пищевого продукта и значения $(p/p^0)_T$ во многих ситуациях тесно связаны. Примеры таких зависимостей приведены на рис. 2.20 и 2.37, а также в табл. 2.11, где приведены различные распространенные микроорганизмы и диапазоны *RVP*,

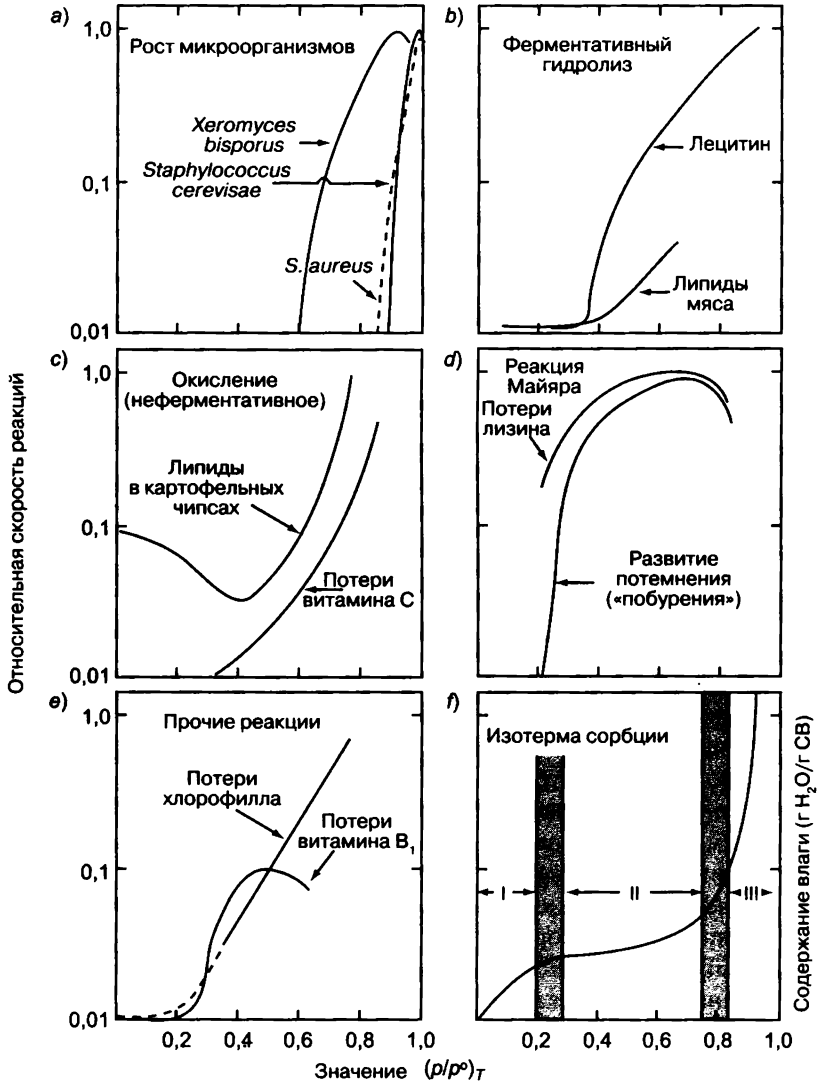


Рис. 2.37. Зависимости между относительным давлением водяного пара (*RVP*), стабильностью пищевого продукта и изотермами сорбции: *a* — рост микроорганизмов в зависимости от $(p/p^0)_T$; *b* — ферментативный гидролиз в зависимости от значения $(p/p^0)_T$; *c* — окисление (неферментативное) в зависимости от значения $(p/p^0)_T$; *d* — реакция Майяра (неферментативного потемнения) в зависимости от $(p/p^0)_T$; *e* — скорости прочих реакций в зависимости от значения $(p/p^0)_T$; *f* — содержание влаги в зависимости от значения $(p/p^0)_T$. Все ординатные оси представляют «относительная скорость» реакций (за исключением *f*). Данные из различных источников

Таблица 2.11

Возможности роста микроорганизмов в пищевых продуктах при различных относительных давлениях водяного пара. По [101]

Диапазон p/p^0	Микроорганизмы, рост которых обычно ингибирован при наименьшем значении p/p^0 данного диапазона	Пищевые продукты, для которых обычно характерен данный диапазон p/p^0
1,00–0,95	*Pseudomonas, Escherischia Proteus, Shigella, Klebsiella, Bacillus, Clostridium perfringens*, некоторые дрожжи	Свежие скоропортящиеся продукты, консервированные фрукты, овощи, мясо, рыба, молоко; вареные колбасные и хлебобулочные изделия; продукты, содержащие до 7%(масс./масс.) хлорида натрия или 40% сахарозы
0,95–0,91	*Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, C. botulinum, Serratia, Lactobacillus*, некоторые плесени, дрожжи (*Rhodolorula, Pichia*)	Некоторые сыры (Чеддер, Швейцарский, Мюнстер, Проволоне), посоленные мясопродукты (ветчина), некоторые концентраты фруктовых соков, продукты, содержащие до 12% (масс./масс.) хлорида натрия или 55% сахарозы
0,91–0,87	Многие дрожжи (*Candida, Torulopsis, Hansenula, Micrococcus*)	Ферментированные колбасные изделия (салями), бисквиты, сухие сыры, маргарин, продукты, содержащие до 15% (масс./масс.) хлорида натрия или 65% сахарозы
0,87–0,80	Большинство плесеней (микотоксигенные пенициллы), *Staphylococcus aureus*, большинство *Saccharomyces* (*bailii*) *spp., Debaryomyces*	Большинство концентратов фруктовых соков, сгущенное молоко с сахаром, шоколадный, кленовый и фруктовые сиропы; мука, рис, бобовые с содержанием влаги 15–17%; пироги с фруктами; ветчина по крестьянски, помадные массы
0,80–0,75	Большинство галофильных бактерий, микотоксикогенные аспергиллы	Джем, мармелад, марципан, глазированные фрукты, некоторые виды маршмеллоу
0,75–0,65	Ксерофильные плесени (*Aspergillus chevalieri, A. candidus, Wallemia sebi*) *Saccharomyces bisporus*	Овсяные хлопья с содержанием влаги 10%; зернистая нуга, фадж, маршмеллоу, желе, меласса, неочищенный тростниковый сахар, некоторые сухофрукты, орехи
0,65–0,60	Осмофильные дрожжи (*Saccharomyces rouxii*), некоторые плесени (*Aspergillus echinulatus, Monascus bisporus*)	Сухофрукты с содержанием влаги 15–20%, ирис, карамель, мед
0,60–0,50	Микроорганизмы не размножаются	Макаронные изделия с содержанием влаги 12%, специи с содержанием влаги 10%
0,50–0,40	То же	Яичный порошок с содержанием влаги 5%
0,40–0,30		Печенье, крекеры, корочка хлеба и т. д. с содержанием влаги 3–5%
0,30–0,20		Сухое цельное молоко (СЦМ) с содержанием влаги 2–3%; сушеные овощи с содержанием влаги 5%; кукурузные хлопья (корнфлекс) с содержанием влаги 5%, домашнее печенье и крекеры

допускающие их рост и размножение [101]. В этой же таблице указаны типичные пищевые продукты, разделенные на категории в зависимости от их *RVP*.

На рис. 2.37 представлены типичные зависимости между скоростью реакции и значениями $(p/p^0)_T$ в диапазоне температур 25–45 °С. В целях сравнения на рис. 2.37, *f* показана типичная изотерма. Важно помнить, что точные скорости реакций, расположение и формы кривых на рис. 2.37 могут меняться в зависимости от состава, физического состояния и структуры образца, состава газовой среды (особенно содержания кислорода), температуры и эффектов гистерезиса. Необходимо помнить, что это всего лишь эмпирическая зависимость между термодинамическим и кинетическим параметрами, и что не существует особых внутренних теоретических причин, почему эти параметры должны коррелировать, поскольку термодинамика имеет дело с состояниями равновесия, а кинетика рассматривает скорости реакций, то есть термодинамика предсказуема, а кинетика эмпирична.

Особого комментария заслуживает необычная зависимость между скоростью окисления липидов и значениями $(p/p^0)_T$ при очень низких величинах последних (см. рис. 2.37). При старте в крайней левой точке

изотермы добавленная вода снижает степень окисления, пока не будет достигнуто содержание влаги, эквивалентное значению *BET*-монослоя. Ясно, что пересушка подверженных окислению образцов приведет к стабильности ниже оптимальной. В работе [102] была предложена следующая интерпретация такого поведения. Первая вода, добавленная в очень сухой образец, связывает гидропероксиды, мешая их разложению и препятствуя тем самым развитию окисления. Кроме того, эта вода гидратирует ионы металлов, которые катализируют окисление.

Добавление воды после границы зон I и II (см. рис. 2.37) приводит к повышению темпов окисления. В указанной работе авторы предположили, что вода, добавленная в этой области изотермы, ускоряет окисление благодаря повышению растворимости кислорода и набуханию макромолекул и, следовательно, увеличению количества доступных каталитических центров. При еще больших значениях $(p/p^0)_T$ (> ~0,80) добавленная вода может замедлить скорость окисления, и предложенное объяснение заключается в том, что разбавление катализаторов снижает их эффективность.

Следует отметить, что кривые для реакции Майяра, разложения витамина B_1 и роста микроорганизмов имеют максимальную скорость при средних и высоких значениях $(p/p^0)_T$ (см. рис. 2.37). Для объяснения снижения скорости реакции, которое иногда сопровождает увеличение *RVP* в пищевых продуктах со средним и высоким содержанием влаги, были предложены две возможности:

в реакциях, в которых образуется вода, увеличение содержания влаги может привести к ингибированию продукта реакции;

если содержание влаги в образце таково, что растворимость, доступность (поверхностей макромолекул) и подвижность компонентов, повышающих скорость реакции, уже больше не являются лимитирующими ее скорость, дальнейшее добавление воды работает только на растворение компонентов, повышающих скорость реакции, то есть на снижение скорости реакции.

Поскольку значение *BET*-монослоя пищевого продукта дает зачастую хорошую первую оценку содержания влаги, обеспечивающего максимальную стабильность сухого продукта, то знание этого значения имеет большое практическое значение. Значение *BET*-монослоя для конкретного пищевого продукта определить несложно, если имеются данные для низковлажного конца изотермы сорбции влаги. Тогда для вычисления значения монослоя можно использовать уравнение *BET*, предложенное в работе [83]:

$$\frac{a_w}{m(1-a_w)} = \frac{1}{m_1 c} + \frac{c-1}{m_1 c} a_w, \qquad (2.12)$$

где a_w — активность воды; m — содержание влаги (г H_2O/г СВ); m_1 — значение *BET*-монослоя; c — константа. На практике в уравнении 2.12 вместо значений a_w используют значения $(p/p^0)_T$.

Из этого уравнения следует, что график $a_w/m(1 \quad a_w)$ относительно a_w, известный как график *BET*, должен быть прямолинейным. Пример для нативного картофельного крахмала с заменой a_w на $(p/p^0)_T$ приведен на рис. 2.38. Общепризнано, что линейная зависимость при значениях $(p/p^0)_T$, превышающих 0,35, начинает ухудшаться.

Значение *BET*-монослоя рассчитывается следующим образом:

Значение монослоя = m_1 =
= 1/[(*y*-пересечение) + (наклон кривой)].

На рис. 2.38 *y*-пересечение составляет 0,6. Расчет наклона кривой дает знчение 10,7. Таким образом:

$m_1 = 1/(0,6 + 10,7) = 0,088$ г H_2O/г СВ.

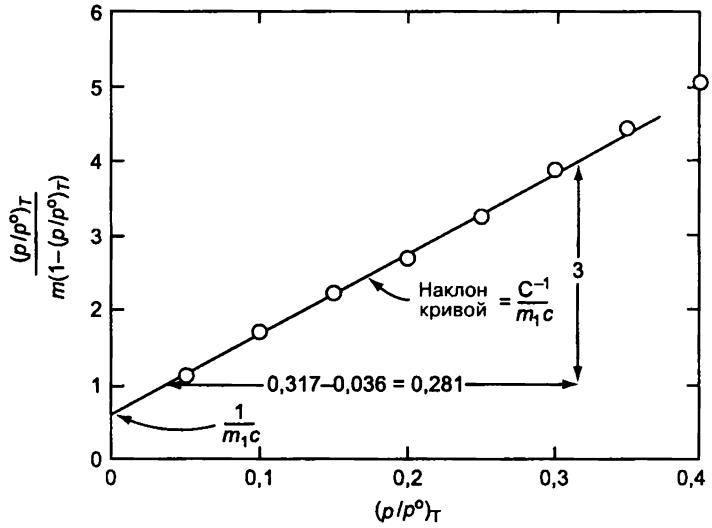


Рис. 2.38. График *BET* для нативного картофельного крахмала (ресорбционные данные, температура 20 °С). По [49]

В этом конкретном примере значение *BET*-монослоя соответствует $(p/p^0)_T = 0{,}2$. Аналогичное значение монослоя дает уравнение *GAB*.

Кроме химических реакций и роста микроорганизмов значение $(p/p^0)_T$ влияет также на текстуру сухих и полусухих пищевых продуктов. Например, низкие значения *RVP* необходимы для сохранения хрустящих свойств крекеров, попкорна и картофельных чипсов, для предотвращения комкования сахарного песка, сухого молока и быстрорастворимого кофе, а также для предотвращения слипания леденцовой карамели. Максимальные допустимые значения $(p/p^0)_T$ сухих материалов без риска потери требуемых свойств варьируют от 0,35 до 0,5 в зависимости от типа продукта [103]. Высокие значения $(p/p^0)_T$ необходимы для пищевых продуктов с мягкой текстурой, способствуя предотвращению их нежелательного затвердевания.

2.13. Сравнения различных подходов

2.13.1. Взаимосвязи между подходами к пониманию роли воды в пищевых продуктах, основанными на значениях *RVP*, подвижности молекул и изотерм сорбции влаги

Равновесная температура замерзания системы обеспечивает измерение ее значения a_w, так как в точке замерзания это значение системы идентично a_w чистого водяного льда при этой же температуре. С учетом этого для выявления соответствий между подходами, основанными на значениях *RVP*, молекулярной подвижности и изотерм сорбции влаги, для понимания роли воды в пищевых продуктах можно построить аннотированную диаграмму состояний (рис. 2.39). Подход, основанный на молекулярной подвижности, мы уже подробно рассматривали с использованием соответствующих диаграмм состояний. Левая верхняя часть на рис. 2.39 соответствует области наибольшего использования *RVP*. Рассмотрим системы с $RVP = 0{,}8$, которые расположены слева от линии, представляющей состав системы с T_m^L, равной −22 °C, то есть с температурой, при которой *RVP* льда равно 0,8. Область основного применения *RVP* для микробиологической стабильности продукта соответствует пунктирному прямоугольнику. Эта область значительно удалена от линий T_d и T_g, и, следовательно, подвижногсть молекул растворенного вещества и растворителя достаточна для быстрой перестройки и приспособления к сохранению долговременного устойчивого состояния при постоянной температуре. При более низких значения *RVP*, присущих системам с гипотетическими равновесными температурами замерзания ниже −30 °C, соответствующее значения меньше 0,75. В таких системах подвижность молекул растворенного вещества снижается, и достичь долговременного устойчивого состояния значительно труднее. При значениях *RVP* менее 0,6 гипотетическая T_m^L будет около −52 °C. Такие системы трудно привести в равновесие, а измерение необходимого для устойчивого состояния значения *RVP* затруднено или вообще невозможно.

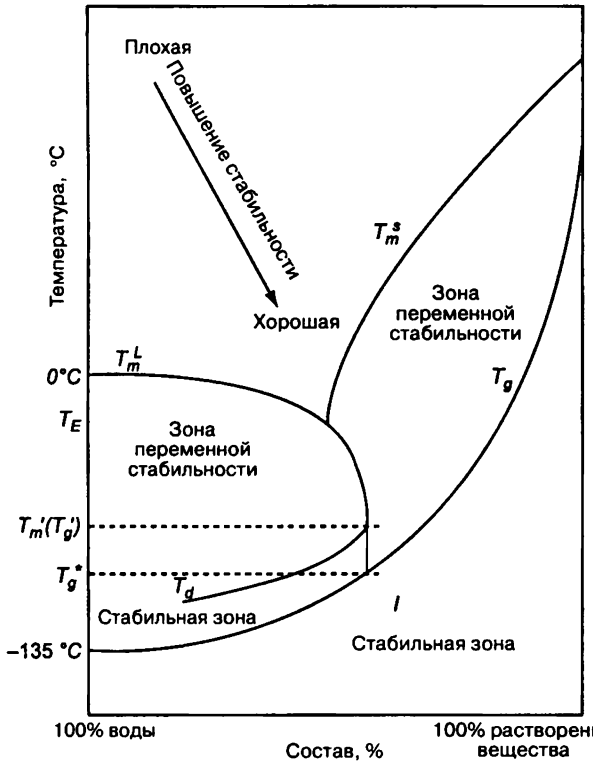


Рис. 2.39. Диаграмма состояний двухкомпонентной системы с обозначением зон потенциальной стабильности

В случае изотермы сорбции влаги используется как сорбция, так и десорбция. Рассмотрим сначала сорбцию. Графики с правой стороны диаграммы состояний представляют сорбцию сухим продуктом (правая ось соответствует полностью сухому продукту). Состояние сухого продукта определяет, какая из линий (T_g или T_m^S) подходит для описания границы

состояния при увеличении содержания влаги. Зачастую в сухом продукте происходит частичная кристаллизация, так что части продукта соответственно рассматриваются по отношению к каждой из этих линий, определяющих изменение физического состояния. Вход в более мобильные жидкие состояния происходит с первоначально низкой подвижностью молекул, и процессы изменения могут быть медленными. Вода проникает в продукт у поверхностей, создавая градиенты подвижности, и, как в случае повышенного содержания влаги, поверхностная подвижность увеличивается, а поверхностная T_g уменьшается. В случае десорбции состав образцов перемещается на диаграмме слева направо, и более жидкая система в ходе десорбции теряет подвижность молекул. Следовательно, ускоренная десорбция приводит к меньшей кристаллизации растворенного вещества по сравнению с более медленной десорбцией.

2.14. Заключение

Каждый из описанных подходов к стабильности продукта наилучшим образом применим в четко определенных условиях. С учетом этого для лучшего понимания роли воды в пищевых продуктах и тех возможных путей и механизмов, посредством которых вода и содержание влаги могут влиять на стабильность продукта, вполне уместно использовать все подходы. Полезный анализ относительной важности каждого подхода в различных условиях приведен в работах [4] и [104]. Вода играет важнейшую роль в химических и физических процессах, происходящих в пищевых продуктах. Несмотря на очевидную простоту молекулы воды, понятно, что сложный характер сетевых водородных связей воды, взаимодействия воды и растворенных веществ, а также прочих взаимодействий межмолекулярных структурных свойств весьма важны для функционирования биологических систем и являются ключом к пониманию свойств пищевых продуктов.

Литература

1. Franks F. *Water, a Matrix of Life.* — London: Royal Society of Chemistry, 2000.
2. Fennema O. Water and ice // *Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter* / O. Fennema, W. D. Powrie, E. H. Marth (eds). — NY: Marcel Dekker, 1973. — P. 1–77.
3. Chaplin M. Water, its importance to life // *Biochem. Mol. Educat.*, 2001, 29, p. 54–59.
4. Schmidt S. J. Water and solids mobility in foods // *Adv. Food Nutr. Res.*, 2004, 48, p. 1–101.
5. Hobbs P. V. *Ice Physics.* — Oxford: Clarendon Press, 1974.
6. Rontgen W. C. VIII Uber die constitution des flussigen wassers // *Ann. Phys. Chem.*, 1882, 281, S. 91–97.
7. Ball P. Life's Matrix, a Biography of Water. — Berkeley, CA: University of California Press, 2001.
8. Guillot B. A molecular–dynamics study of the far infrared spectrum of liquid water // *J. Chem. Phys.*, 1991, 95, p. 1543–1551.
9. Errington J. R., Debenedetti P. G. Relationship between structural order and the anomalies of liquid water // *Nature* (London), 2001, 409, p. 318–321.
10. Guillot B. A reappraisal of what we have learned during 3 decades of computer simulations on water // *J. Mol. Liquids*, 2002, 101, p. 219–260.
11. Bertoluzza A., Fagnano C., Morelli M. A., Tinti A., Tosi M. R. The role of water in biological systems // *J. Mol. Struct.*, 1993, 297, p. 425–437.
12. Luck W. A. P. Structures of water in aqueous systems // *Water Activity: Influences on Food Quality* / L. B. Rockland, G. F. Stewart (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 407–434.
13. Sceats M. G., Rice S. A. Amorphous solid water and its relationship to liquid water: a random network model for water // *Water, a Comprehensive Treatise* / F. Franks (ed.). — NY: Plenum Press, 1982. — P. 83–214.
14. Stillinger F. H. Water revisited // *Science*, 1980, 209, p. 451–457.
15. Brady G. W., Romanov W. J. Structure of water // *J. Chem. Phys.*, 1960, 32, p. 106.
16. Morgan J., Warren B. E. X–ray analysis of the structure of water // *J. Chem. Phys.*, 1938, 6, p. 666–673.
17. Cheftel J. C., Levy J., Dumay E. Pressure–assisted freezing and thawing: principles and potential applications // *Food Rev. Int.*, 2000, 16, p. 453–483.
18. Cheftel J. C., Thiebaud M., Dumay E. High pressure–low temperature processing of foods: a review. Advances in high pressure bioscience and biotechnology II // *Proceedings of the International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Dortmund, Germany, September 16–19, 2002, p. 327–340.
19. Luyet B. On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperature // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1960, 85, p. 549–569.
20. Luyet B. J. Anatomy of the freezing process in physical systems // *Cryobiology* / H. T. Meryman (ed.). — NY: Academic Press, 1966. — P. 115–138.

21. Rapatz G., Luyet B. Patterns of ice formation and rates of ice growth in gelatin solutions // *Biodynamica,* 1972, 11, p. 117–123.
22. Rey L. R. Etude Physiologique et Physico–Chimique de l'Action des Basses Temperatures sur les Tissues Animaux. — Paris, France: Universite de Paris, 1958.
23. Simatos D., Rey L. Freeze–drying of biologic materials // *Fed. Proc.,* 1965, 24, p. 213–215.
24. Berendsen H. J. C. The molecular dynamics of water in biological systems // *Proc. First Europ. Biophys. Cong.,* 1971, 1, p. 483–488.
25. Kuntz I. D., Kauxmann W. Hydration of proteins and polypeptides // *Adv. Protein Chem.,* 1974, 28, p. 239–345.
26. Geiger A. Molecular dynamics simulation study of the negative hydration effect in aqueous electrolyte solutions // *Berichte der Bunsen–Gesellschaft,* 1981, 85, S. 52–63.
27. Eagland D. Nucleic acids, peptides and proteins // *Water, a Comprehensive Treatise* / F. Franks (ed.). — NY: Plenum, 1975. — P. 305–518.
28. Lewin S. Displacement of Water and its Control of Biochemical Reactions. — London: Academic Press, 1974.
29. Tait M. J., Suggett A., Franks F., Ablett S., Quickenden P. A. Hydration of monosaccharides. Study by dielectric and nuclear magnetic relaxation // *J. Solution Chem.* 1972, 1, p. 131–151.
30. Franks F. Protein hydration // *Characteristics of Proteins* / F. Franks (ed.). — Clifton, NJ: Humana Press, 1988. — P. 127–154.
31. Franks F. The hydrophobic interaction // *Water, a Comprehensive Treatise* / F. Franks (ed.). — NY: Plenum Press, 1975. P. 1–94.
32. Davidson D. W. Clathrate hydrates // *Water, a Comprehensive Treatise* / F. Franks (ed.). — NY: Plenum Press, 1975. — P. 115–234.
33. Koga K., Tanaka H., Nakanishi K. Stability of polar guest–encaging clathrate hydrates // *J. Chem. Phys.,* 1994, 101, p. 3127–3134.
34. Koga K., Tanaka H., Nakanishi K. On the stability of clathrate hydrates encaging polar guest molecules: contrast in the hydrogen bonds of methylamine and methanol hydrates // *Mol. Simul.,* 1994, 12, p. 241–252.
35. Gerstein M., Lynden–Bell R. M. Simulation of water around a model protein helix. 1. Two–dimensional projections of solvent structure // *J. Phys. Chem.,* 1993, 97, p. 2982–2990.
36. Uedaira H. Properties and structure of water // *Kagaku to Kyoiku,* 1995, 43, p. 494–500.
37. Head–Gordon T. Is water structure around hydrophobic groups clathrate–like? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1995, 92, p. 8308–8312.
38. Teeter M. M. Water–protein interactions: theory and experiment // *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.,* 1991, 20, p. 577–560.
39. Lounnas V., Pettitt B. M. A connected cluster of hydration around myoglobin. Correlation between molecular dynamics simulations and experiment // *Proteins: Struc. Func. Genet.,* 1994, 18, p. 133–147.
40. Edelhoch H., Osborne J. J. C. The thermodynamic basis of the stabilty of proteins, nucleic acids and membranes // *Adv. Protein Chem.,* 1976, 30, p. 183–250.
41. Oakenfull D., Fenwick D. E. Thermodynamics and mechanism of the hydrophobic interaction // *Aust. J. Chem.,* 1977, 30, p. 741–752.
42. Ashbaugh H. S., Truskett T. M., Debenedetti P. G. A simple molecular thermodynamic theory of hydrophobic hydration // *J. Chem. Phys.,* 2002, 116, p. 2907–2921.
43. Johnson M. R., Lin R. C. FDA views on the importance of a_w in good manufacturing practice // *Water Activity: Theory and Applications to Food* / L. B. Rockland, Beuchat L. R. (eds). — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 287–294.
44. Scott W. J. Water relations of *Staphilococcus aureus* at 30 °C // *Aust. J. Biol. Sci.,* 1953, 6, p. 549–556.
45. Scott W. J. Water relations of food spoilage organisms // *Adv. Food Res.,* 1957, 7, p. 83–127.
46. Chirife, J. (1994) Specific solute effects with special reference to *Staphylococcus aureus* // *J. Food Eng.,* 1957, 22, p. 409–419.
47. Gal S. Recent developments in techniques for obtaining complete sorption isotherms // *Water Activity: Influnce on Food Quality* / L. B. Rockland, G. F. Stewart (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 89–110.
48. Spiess W. E. L., Wolf W. Critical evaluation of methods to determine moisture sorption isotherms // *Water Activity: Theory and Application to Foods* / L. B. Rockland, L. R. Beuchat (eds.). — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 215–233.
49. van den Berg C. Vapour Sorption Equilibria and Other Water-Starch Interactions: A Physico-Chemical Approach. — Wageningen, The Netherlands: Wageningen Agricultural University, 1981.
50. van den Berg C., Bruin S. Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects // *Water Activity: Influences on Food Quality* / L. B. Rockland, G. F. Stewart (eds.). — NY: Academic Press, 1981. — P. 1–61.
51. Reid D. S., Fontana A., Rahman S., Sablami S., Labuza T. Vapor pressure measurements of water // *Handbook of Food Analytical Chemistry* / R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith, P. Sporns (eds.). — NY: Wiley, 2005. — Section A2.
52. Kapsalis J. G. Influences of hysteresis and temperature on moisture sorption isotherms // *Water Activity: Theory and Applications to Foods Foods* / L. B. Rockland, L. R. Beuchat (eds.). — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 173–213.
53. Fennema O., Berny L.A. Equilibrium vapor pressure and water activity of food at subfreezing temperatures // *Fourth Int. Congress of Food Science and Technology,* Madrid, Spain, 1974.

54. Williams M. L., Landel R. F., Ferry J. D. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids // *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, p. 3701–3707.
55. Ferry J. D. *Viscoelastic Properties of Polymers.* — 3rd ed. — NY: John Wiley & Sons, 1980.
56. White G. W., Cakebread S. H. The glassy state in certain sugar-containing food products // *J. Food Technol.*, 1966, 1, p. 73–82.
57. White G. W., Cakebread S. H. Importance of the glassy state in certain sugar-containing food products // *Food Sci. Technol. Proc. Int. Congr.*, 1969, 1st, p. 227–235.
58. Duckworth R. B., Allison J. Y., Clapperton H. A. The aqueous environment for change in intermediate moisture foods // *Intermediate Moisture Foods* / R. Davies, G. G. Birch, K. J. Parker (eds). — London:, Applied Science, 1976. — P. 89–99.
59. Franks F. Aqueous solutions —a new perspective. Amorphous carbohydrates: science and application technology // *J. Solution Chem.*, 1995, 24, p. 1093–1097.
60. Slade L., Levine H. A food polymer science approach to structure–property relationships in aqueous food systems: non-equilibrium behavior of carbohydrate–water systems // *Adv. Exptl Med. Biol.*, 1991, 302, p. 29–101.
61. Slade L., Levine H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1991, 30, p. 115–360.
62. Levine H., Slade L. «Collapse» phenomena — a unifying concept for interpreting the behavior of low moisture foods // *Food Structure — Its Creation and Evaluation* / J. M. V. Blanshard, J. R. Mitchell (eds). — London: Butterworths, 1988. — P. 149–180.
63. Levine H., Slade L. Water as a plasticizer: physico-chemical aspects of low moisture polymeric systems // *Water Sci. Rev.*, 1988, 3, p. 79–185.
64. Slade L., Levine H. Polymer science approach to water relationships in foods // *Food Preservation by Moisture Control* / G. V. Barbosa-Canovas, J. Welti-Chanos (eds). — Lancaster, PA: Technomic Press, 1995. — P. 33–132.
65. Slade L., Levine H. Glass transitions and water–food structure interactions // *Adv. Food Nutr. Res.*, 1995, 38, p. 103–269.
66. Shalaev E. Y., Kanev A. N. Study of the solid–liquid state diagram of the water–glycine–sucrose system // *Cryobiology*, 1994, 31, p. 374–382.
67. Liu B., Hua Z., Ren H. The glassy state storage of frozen food // *Zhileng Xuebao*, 1996, p. 26–31.
68. Boutron P., Mehl P., Kauffmann A., Angibaud P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. I. Binary systems water–poly alcohol // *Cryobiology*, 1986, 23, p. 453–469.
69. Levine H., Slade L. Thermomechanical properties of small-carbohydrate–water glasses and «rubbers»: kinetically metastable systems at sub-zero temperatures // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I: Phys. Chem. Condens. Phases*, 1988, 84, p. 2619–2633.
70. Roos Y. Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates // *Carbohydr. Res.*, 1993, 238, p. 39–48.
71. Hatley R. H. M., Mant A. Determination of the unfrozen water content of maximally freeze concentrated carbohydrate solutions // *Int. J. Macromol.*, 1993, 15, p. 227–232.
72. Reid D. S., Hsu J., Kerr W. L. Calorimetry // *The Glassy State in Foods* / J. M. V. Blanshard, P. J. Lillford (eds). — Loughborough: Nottingham University Press, 1993. — P. 123–132.
73. Roos Y. H., Karel M. Effect of glass transitions on dynamic phenomena in sugar containing food systems // *The Glassy State in Foods* / J. M. V. Blanshard, P. J. Lillford (eds). — Loughborough: Nottingham University Press, 1993. — P. 207–222.
74. Simatos D., Blond G. DSC studies and stability of frozen foods // *Adv. Exptl Med. Biol.*, 1991, 302, p. 139–155.
75. Slade L., Levine H., Ievolella J., Wang M. The glassy state phenomenon in applications for the food industry: application of the food polymer science approach to structure–function relationships of sucrose in cookie and cracker systems // *J. Sci. Food Agric.*, 1993, 63, p. 133–176.
76. Angell C. A. Entropy and fragility in supercooling liquids // *J. Res. Natl Inst. Stand. Technol.* 1997, 102, p. 171–185.
77. Angell C.A. Water, what we know and what we don't // *Water Science for Food, Health Agriculture and Environment* / Z. Berk, R. B. Leslie, P. J. Lillford, S. Mizrahi (eds.). — Lancaster, PA: Technomic, 2001. — P 1–30.
78. Kerr W. L., Lim M. H., Reid D. S., Chen H. Chemical reaction kinetics in relation to glass transition temperatures in frozen food polymer solutions // *J. Sci. Food Agric.*, 1993, 61, p. 51–56.
79. Kerr W. L., Reid D. S. Temperature dependence of the viscosity of sugar and maltodextrin solutions in coexistence with ice // *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 1994, 27, S. 225–231.
80. Matveev Y. I., Ablett S. Calculation of the C'_g and T'_g intersection point in the state diagram of frozen solutions // *Food Hydrocoll.*, 2002, 16, p. 419–422.
81. Roos Y., Karel M. Nonequilibrium ice formation in carbohydrate solutions // *Cryo-Letters*, 1991, 12, p. 367–376.
82. Roos Y., Karel M. Phase transitions of amorphous sucrose and frozen sucrose solutions // *J. Food Sci.*, 1991, 56, p. 266–267.
83. Brunauer S., Emmett H. P., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers // *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, 60, p. 309–319.
84. Guggenheim E. A. *Applications of Statistical Mechanics.* — Oxford: Clarendon Press, 1966. — P. 186–206.
85. Anderson R. B. Modifications of the Brunauer, Emmett, and Teller equation // *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68, p. 686–691.
86. De Boer J. H. *The Dynamical Character of Adsorption.* — 2nd ed. — Oxford, UK: Clarendon Press, 1968. — P. 200–219.
87. Lillford P. J., Clark A. H., Jones D. V. *Distribution of Water in Heterogeneous Food and Model Systems* // ACS Symposium Series 127, 1980, p. 177–195.

88. Belton P. S., Hills B. P. The effects of exchange and interfacial reaction in two–phase systems on NMR line shapes and relaxation processes // *Mol. Phys.*, 1988, 65, p. 313–326.
89. Hills B. P. The proton exchange cross–relaxation model of water relaxation in biopolymer systems // *Mol. Phys.*, 1992, 76, p. 489–508.
90. Hills B. P. Multinuclear relaxation studies of water in carbohydrate and protein systems // *Spectroscopy* (Amsterdam, Netherlands), 1990, 8, p. 149–171.
91. Hills B. P., Nott K. P. NMR studies of water compartmentation in carrot parenchyma tissue during drying and freezing // *Appl. Magn. Resonance,* 1999, 17, p. 521–535.
92. Karel M. Role of water activity // *Food Properties and Computer–Aided Engineering of Food Processing Systems* / R. P. Singh, A. G. Medina (eds). —: Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 1988. — P. 135–155.
93. Labuza T. P., McNally L., Gallagher D., Hawkes J., Hurtado F. Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid oxidation // *J. Food Sci.*, 1972, 37, p. 154–159.
94. Labuza T. P., Cassil S., Sinskey A. J. Stability of intermediate moisture foods. II. Microbiology // *J. Food Sci.* 1972, 37, p. 160–162.
95. Leisen J., Beckham H. W., Benham M. Sorption isotherm measurements by NMR // *Solid State Nucl. Magn. Resonance,* 2002, 22, p. 409–422.
96. Mauer L. J., Smith D. E., Labuza T. P. Effect of water content, temperature and storage on the glass transition, moisture sorption characteristics and stickiness of β–casein // *Int. J. Food Properties,* 2000, 3, p. 233–248.
97. Schaller–Povolny L. A., Smith D. E., Labuza T. P. Effect of water content and molecular weight on the moisture isotherms and glass transition properties of inulin // *Int. J. Food Properties,* 2000, 3, p. 173–192.
98. Teoh H. M., Schmidt S. J., Day G. A., Faller J. F. Investigation of cornmeal components using dynamic vapor sorption and differential scanning calorimetry // *J. Food Sci.*, 2001, 66, p. 434–440.
99. Iglesias H. A., Chirife J. Handbook of Food Isotherms: Water Sorption Parameters for Food and Food Components. — NY: Academic Press, 1982. — P. 347.
100. Rupley J. A., Careri G. Protein hydration and function // *Adv. Protein Chem.*, 1991, 41, p. 37–172.
101. Beuchat L. R. Microbial stability as affected by water activity // *Cereal Foods World,* 1981, 26, p. 345–349.
102. Karel M., Yong S. Autoxidation–initiated reactions in foods // *Water Activity: Influences Food Quality* / L. B. Rockland, G. F. Stewart (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 511–529.
103. Labuza T. P., Contreras–Medellin R. Prediction of moisture protection requirements for foods // *Cereal Foods World,* 1981, 26, p. 335–344.
104. Sherwin C. P., Labuza T. P. Beyond water activity and glass transition: a broad perspective on the manner by which water can influence reaction rates in foods // *Water Properties of Food, Pharmaceutical and Biological Materials* / M. P. Buera, J. Welti–Chanos, P. J. Lillford, H. R. Corti (eds). — Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. — P. 343–371.
105. Suggett A. Molecular motion and interactions in aqueous carbohydrate solutions. III. A combined nuclear magnetic and dielectric–relaxation strategy // *J. Solution Chem.*, 1976, 5, p. 33–46.
106. Berendsen H. J. C. Specific interaction of water with biopolymers // *Water, a Comprehensive Treatise* / F. Franks (ed.). — NY: Plenum Press, 1975. — P. 293–349.
107. van den Berg C., Leniger H. A. The water activity of foods // *Miscellaneous Papers 15.* — Wageningen, The Netherlands: Wageningen Agricultural University, 1978. — P. 231–244.
108. Fennema O. Enzyme kinetics at low temperature and reduced water activity // *Dry Biological Systems* / J. H. Crowe, J. H. Clegg (eds). — NY: Academic Press, 1978. — P. 297–322.
109. Gorling P. Physical phenomena during the drying of foodstuffs // *Fundamental Aspects of the Dehydration of Foodstuffs.* — London: Society of Chemical Industry, 1958. — P. 42–53.
110. Lide D. R. (ed.) *Handbook of Chemistry and Physics.* — 74 ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1993/1994.
111. Mason B. J. *The Physics of Clouds.* — Oxford: Clarendon Press, 1957. — P. 445.
112. Levine H., Slade L. Cryostabilization technology // *Thermal Analysis of Foods* / V. R. Harwalkar, C.–Y. Ma (eds.). — London: Elsevier Applied Science, 1990. — P. 221–305.
113. Otting G., Liepinsh B., Wuthrich K. Protein hydration in aqueous solution // *Science,* 1991, 254, p. 974–980.
114. Lounnas V., Pettitt B. M. Distribution function implied dynamics versus residence times and correlations: solvation shells of myoglobin // *Proteins: Struct. Func. Genet.*, 1994, 18, p. 148–160.
115. Levine H., Slade L. A food polymer science approach to the practice of cryostabilization technology // *Comments Agric. Food Chem.*, 1989, 1, p. 315–396.
116. Jouppila K., Roos Y.H. Glass transitions and crystallization in milkpowders // *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, p. 2907–2915.

3. Углеводы

Джеймс Н. БеМиллер (*James N. BeMiller)* и Кэрри С. Хубер (*Kerry C. Huber)*
Перевод Н. С. Селивановой под науч. ред. чл.-корр. РАМН, д-ра мед. наук, проф. М. М. Гаппарова

Содержание

3.1. Моносахариды ... 88
3.1.1. Изомеризация моносахаридов ... 90
3.1.2. Формы колец моносахаридов ... 91
3.1.3. Гликозиды ... 93
3.1.4. Реакции моносахаридов ... 94
3.1.4.1. Окисление до альдоновых кислот и альдонолактонов ... 94
3.1.4.2. Восстановление карбонильных групп ... 95
3.1.4.3. Уроновые кислоты ... 96
3.1.4.4. Сложные эфиры ... 96
3.1.4.5. Простые эфиры ... 97
3.1.4.6. Неферментативное потемнение ... 98
3.1.4.7. Карамелизация ... 101
3.1.4.8. Образование акриламида ... 102
3.2. Олигосахариды 104
3.2.1. Мальтоза 104
3.2.2. Лактоза 105
3.2.3. Сахароза 106
3.2.4. Циклодекстрины 107
3.3. Полисахариды ... 108
3.3.1. Химическая структура и свойства полисахаридов 108
3.3.2. Растворимость полисахаридов 109
3.3.3. Вязкость и стабильность растворов полисахаридов 110
3.3.4. Гели 113
3.3.5. Гидролиз полисахаридов 114
3.3.6. Крахмал 114
3.3.6.1. Амилоза 115
3.3.6.2. Амилопектин 115
3.3.6.3. Гранулы крахмала 122
3.3.6.4. Клейстеризация крахмала 123
3.3.6.5. Применение немодифицированных крахмалов 125
3.3.6.6. Клейстеризация крахмала в растительных тканях 126
3.3.6.7. Ретроградация крахмала и черствение 127
3.3.6.8. Комплексы крахмала 128
3.3.6.9. Гидролиз крахмала 128
3.3.6.10. Модифицированные пищевые крахмалы 131
3.3.6.11. Крахмал, растворимый в холодной воде 135
3.3.6.12. Крахмал, набухающий в холодной воде 135
3.3.7. Целлюлоза, ее формы и производные 136
3.3.7.1. Микрокристаллическая целлюлоза 136
3.3.7.2. Карбоксиметилцеллюлоза 137
3.3.7.3. Метил- и гидроксипропилметилцеллюлозы 137
3.3.8. Гуаровая камедь и камедь рожкового дерева 138
3.3.9. Ксантановая камедь 139
3.3.10. Каррагинаны, агар и фурцеллеран ... 140

3.3.11. Альгинаты 143
3.3.12. Пектины 145
3.3.13. Гелловая камедь 146
3.3.14. Курдлан 147
3.3.15. Гуммиарабик 147
3.3.16. Инулин и фруктоолигосахариды 148
3.4. Пищевые волокна и перевариваемость углеводов 149
Дополнительная литература 151
Использованная литература 151

Углеводы составляют более 90% сухой массы растений. Они широко распространены, легко доступны и недороги. Углеводы (как нативные, так и добавляемые) являются обычными компонентами пищевых продуктов. Ассортимент продуктов, содержащих углеводы, а также потребляемое количество углеводов очень велики. Углеводы характеризуются различной молекулярной структурой, размером и формой молекул, обладают разными химическими и физическими свойствами и оказывают различное физиологическое действие на организм человека. Углеводы подвержены и химическим, и биохимическим модификациям, причем такие модифицированные углеводы с улучшенными свойствами широко применяются в промышленности.

Крахмал, лактоза и сахароза хорошо усваиваются здоровыми людьми и наряду с *D*-глюкозой и *D*-фруктозой являются источниками энергии, обеспечивая по среднемировым оценкам 70–80% поступления калорий с пищей. В США эта цифра немного ниже и широко варьирует в зависимости от конкретного человека.

Термин «углеводы» предполагает некоторую общую химическую структуру $C_x(H_2O)_y$, в которой наряду с атомами углерода содержатся атомы водорода и кислорода в том же соотношении, что и в молекуле воды, однако у подавляющего большинства природных углеводных соединений, вырабатываемых живыми организмами, структурные формулы гораздо сложнее. Более того, большинство природных углеводов имеют форму олигомеров (олигосахаридов) или полимеров (полисахаридов) простых и модифицированных сахаров. Источником низкомолекулярных углеводов зачастую служат деполимеризованные природные полимеры. Эту главу мы начнем с рассмотрения простых сахаров, а затем перейдем к более сложным структурам.

3.1. Моносахариды

Углеводы содержат хиральные атомы углерода, представляющие собой атомы, которые могут существовать в двух различных пространственных расположениях (конфигурациях). К хиральным атомам углерода присоединены четыре различные группы. Две различные пространственные конфигурации этих четырех групп являются ненакладывающимися зеркальными отображениями друг друга (рис. 3.1), то есть одна из них является зеркальным отображением другой (все, что в одной конфигурации находится справа, то у другой — слева, и наоборот).

D-глюкоза, наиболее распространенный углевод и органическое вещество (включая все его комбинированные формы), относится к классу углеводов, называемых моносахаридами. Моносахариды — это углеводы, которые не расщепляются гидролизом на более простые молекулы углеводов, и поэтому их иногда называют простыми сахарами. Они представляют собой мономерные единицы, образующие при их соединении более сложные структуры — олигосахариды и полисахариды (см. далее разделы 3.2 и 3.3), которые при гидролизе разлагаются на составляющие их моносахариды.

D-глюкоза — это одновременно и полиспирт, и альдегид. Ее относят к альдозам, то есть к сахарам с альдегидной группой (табл. 3.1). Суффикс «-оз» означает принадлежность к сахарам, а «альд-» означает альдегидную группу.

Когда структуру *D*-глюкозы изображают в открытом (вертикальном) виде с прямой цепью (рис. 3.2, «ациклическая структура»), где сверху расположена альдегидная группа (у атома углерода 1), а снизу — первичная гидроксильная группа (у атома углерода 6), то видно, что все вторичные гидроксильные группы

Таблица 3.1
Классификация моносахаридов

Число атомов углерода	Тип карбонильной группы	
	Альдегид	Кетон
3	Триоза	Триулоза
4	Тетроза	Тетрулоза
5	Пентоза	Пентулоза
6	Гексоза	Гексулоза
7	Гептоза	Гептулоза
8	Октоза	Октулоза
9	Ноноза	Нонулоза



Зеркало

Рис. 3.1. Хиральный атом углерода. Символами A, B, D, и E обозначены атомы, функциональные группы или группы атомов, присоединенные к атому углерода C. Полужирными клиньями обозначены химические связи, направленные вдоль плоскости этой страницы, а черточками — связи, направленные перпедикулярно к ней

располагаются на атомах углерода 2, 3, 4 и 5, у каждого из которых четыре различных присоединенных к ним заместителя, и поэтому они хиральны. Встречающаяся в природе глюкоза представлена *D*-формой, то есть *D*-глюкозой, у которой имеется зеркальное отражение, называемое *L*-глюкозой. Так как зеркальное отражение характерно для всех хиральных атомов углерода, то всего для этих атомов может существовать 2^n конфигураций. Именно поэтому у альдозы из 6 атомов углерода (типа *D*-глюкозы с четырьмя хиральными атомами углерода) существует 2^4, то есть 16 различных конфигураций углеродных атомов со вторичными гидроксильными группами, позволяющих образовывать из 6 атомов углерода 16 различных сахаров с альдегидной группой на конце. Восемь из них относятся к *D*-ряду (рис. 3.3), а восемь других являются их зеркальным отражением и относятся к *L*-ряду. Все сахара с расположенной справа гидроксильной группой при хиральном атоме углерода с наибольшим номером (в данном случае — C_5) условно называют *D*-сахарами, а все сахара с расположенной слева гидроксильной группой при хиральном атоме углерода с наибольшим номером — *L*-сахарами. Две структуры *D*-глюкозы в форме с открытой цепью или в ациклической форме, называемой проекцией Фишера, с пронумерованными атомами углерода представлены на рис. 3.2. В таком представлении каждая горизонтальная связь направлена вдоль плоскости страницы, а каждая вертикальная — перепендикулярно ей (обычно горизонтальные линии ковалентных связей к атомам водорода и гидроксильным группам опускают, см. структуру справа). Поскольку последний атом углерода нехирален, то относительное положение присоединенных к нему атомов и групп не указывают и записывают эту группу как $—CH_2OH$.

D-глюкоза и все другие сахара с шестью атомами углерода называют гексозами, относящимися к группе альдоз и представленными в природе в наибольшем количестве. Названия, определяющие принадлежность к классу, зачастую комбинируют, и альдегидный сахар с шестью атомами углерода называют альдогексозой.

Существуют две альдозы с тремя атомами углерода — *D*-глицериновый (*D*-глицероза) и *L*-глицериновый альдегиды (*L*-глицероза), имеющие один хиральный атом углерода. У альдоз с четырьмя атомами углерода (тетрозы) два хиральных атома углерода, а у альдоз с пятью атомами углерода (пентозы) — три; последние образуют вторую по распространенности группу альдоз. Ряды с более чем шестью атомами углерода (гептозы, октозы и нонозы) завершают встречающиеся в природе сахара. Восемь *D*-гексоз на основе *D*-глицеринового альде-

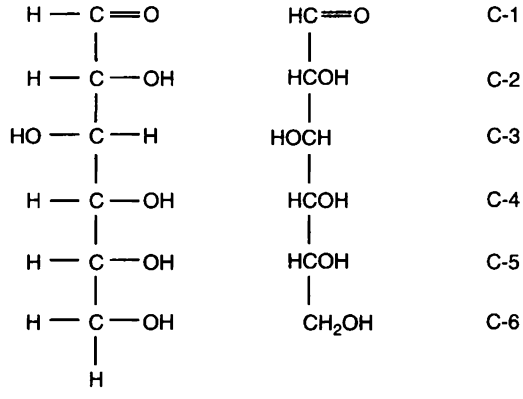


Рис. 3.2. Структурная формула *D*-глюкозы (с открытой цепью или ациклическая структура)

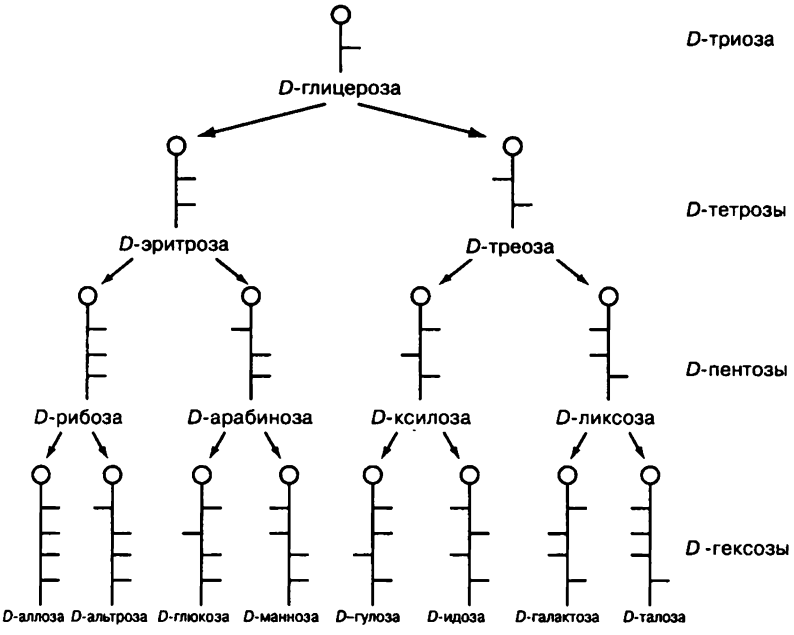


Рис. 3.3. Структура Розанова для *D*-альдоз, содержащих от 3 до 6 атомов углерода

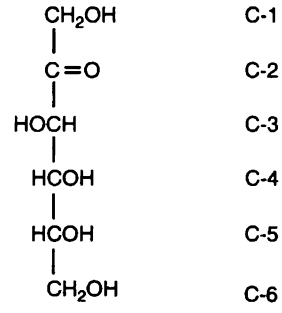


Рис. 3.4. Ациклическая структура *D*-фруктозы

гида представлены на рис. 3.3, где кружками обозначены альдегидные группы, горизонтальными черточками — расположение каждой карбоксильной группы на хиральном атоме углерода, а нижними концами вертикальных линий — концевая нехиральная первичная гидроксильная группа (—CH_2OH). Такой простейший способ отображения структуры моносахаридов называется структурой Розанова. Сахара, представленные на рис. 3.3, обычно обнаруживаются в растениях почти исключительно в комбинированных формах гликозидов, олиго- и полисахаридов (см. ниже). *D*-глюкоза — это единственная свободная альдоза, представленная в натуральных пищевых продуктах, причем в очень в малых количествах.

L-сахаров меньше и они менее распространены в природе, чем *D*-сахара, но они выполняют важные биохимические функции. К двум обнаруженным в пищевых продуктах *L*-сахарам относятся *L*-арабиноза и *L*-галактоза, каждый из которых входит в состав углеводных полимеров (полисахаридов).

В другом типе моносахаридов карбонильным соединением является кето-группа, и такие сахара называют кетозами («кет-» означает кето-группу). В систематической номенклатуре углеводов суффикс «-улоз» обозначет принадлежность к кетозам (см. табл. 3.1). Первый представитель этой группы сахаров — *D*-фруктоза (систематическое наименование —*D*-арабино-гексулоза, рис. 3.4), являющаяся одной из двух моносахаридных единиц дисахарида сахарозы (см. далее раздел 3.2.3), которая составляет около 55% обычного высокофруктозного сиропа (ВФС) и около 40% меда. У *D*-фруктозы только три хиральных атома углерода (C_3, C_4 и C_5), то есть существует 2^3(8) кетогексоз. *D*-фруктоза — единственная промышленно выпускаемая кетоза и единственная, обнаруженная в свободном состоянии в натуральных пищевых продуктах, причем, как и *D*-глюкоза, лишь в малых количествах.

3.1.1. Изомеризация моносахаридов

Простые альдозы и кетозы с одинаковым количеством атомов углерода являются изомерами друг друга. Так, гексоза и гексулоза имеют эмпирическую формулу $C_6H_{12}O$ и могут изомеризоваться друг в друга. Изомеризация моносахаридов охватывает карбонильную и соседнюю гидроксильную группу. При этой реакции одна альдоза превращается в другую с противоположной конфигурацией при C_2 и соответствующую кетозу, а последняя — в две соответствующие альдозы. Таким образом, при изомеризации *D*-глюкоза, *D*-манноза и *D*-фруктоза могут быть превращены друг в друга (рис. 3.5). Изомеризация катализируется как основаниями, так и ферментами.

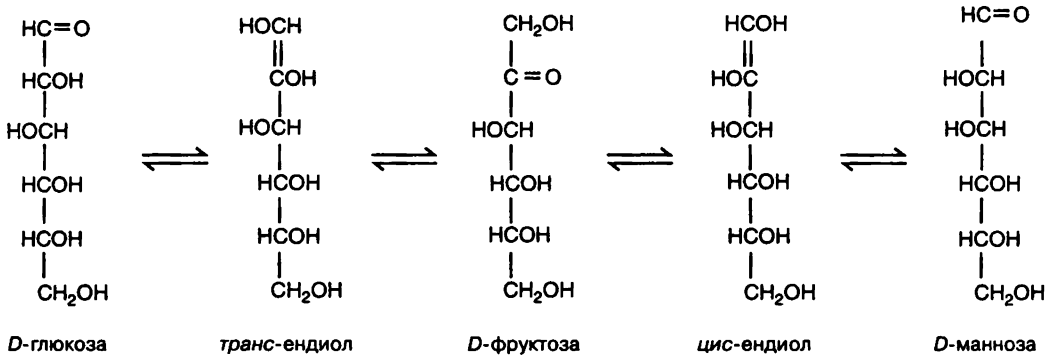


Рис. 3.5. Взаимосвязи *D*-глюкозы, *D*-маннозы и *D*-фруктозы при изомеризации

3.1.2. Формы колец моносахаридов

Карбонильные группы альдегидов реакционноспособны и быстро подвергаются нуклеофильной атаке атома кислорода гидроксильной группы с образованием полуацеталя. Гидроксильная группа полуацеталя может реагировать далее с гидроксильной группой спирта с образованием ацеталя (рис. 3.6). Карбонильная группа кетона реагирует аналогичным образом.

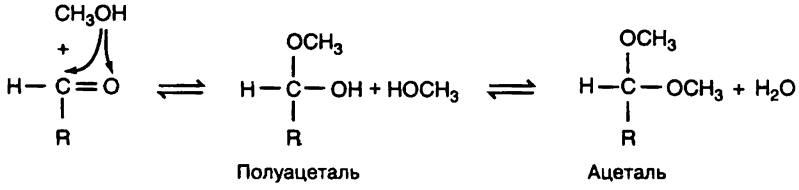


Рис. 3.6. Образование ацеталя при реакции альдегида с метанолом

Образование полуацеталя может происходить внутри одной молекулы альдозы или кетозы так, что карбонильная группа сахара реагирует с одной из его гидроксильных групп (рис. 3.7, где молекула *D*-глюкозы слева свернута). Шестичленное кольцо сахара, образовавшееся по реакции альдегидной группы с гидроксильной группой при C_5, называется пиранозным кольцом. Обратите внимание, что когда атом кислорода гидроксильной группы при C_5 реагирует с образованием кольца, то этот атом углерода должен вращаться так, чтобы атом кислорода оказался сверху. В ходе такого вращения гидроксиметильная группа C_6 переносится в позицию «над кольцом». Подобное представление *D*-глюкопиранозного кольца (см. рис. 3.7) называется проекцией Хеуорса (*Haworth*).

Сахара также встречаются в форме пятичленных (фуранозных) колец (рис. 3.8), но реже, чем в форме пиранозных.

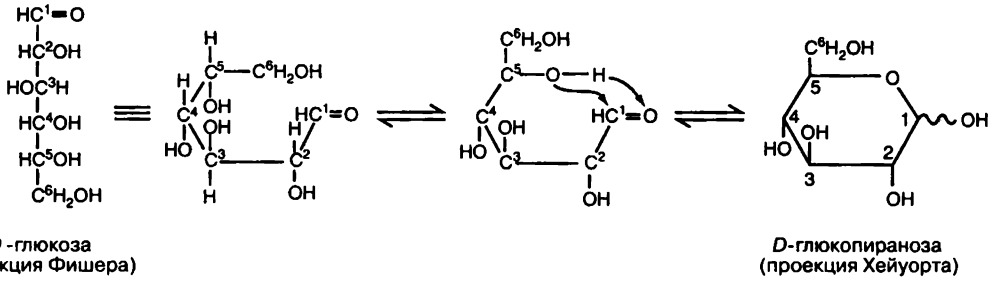


Рис. 3.7. Образование пиранозного полуацетального кольца из *D*-глюкозы

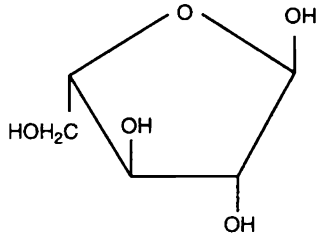
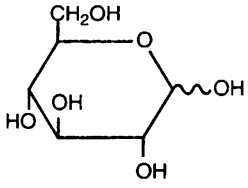
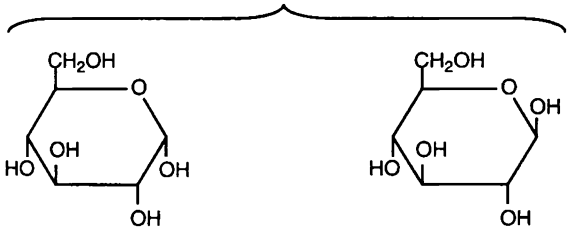


Рис. 3.8. *L*-арабиноза с кольцом в фуранозной форме и α-*L*-конфигурации



D-глюкопираноза



α-*D*-глюкопираноза β-*D*-глюкопираноза

Рис. 3.9. *D*-глюкопираноза как смесь двух хиральных форм

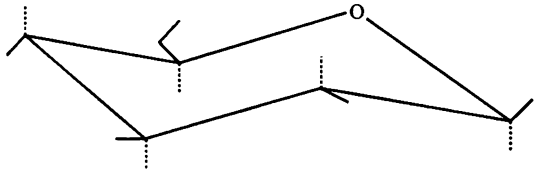


Рис. 3.10. Пиранозное кольцо в конформации «кресла» с указанием экваториальных (сплошная линия) и аксиальных (точечная линия) связей

Во избежание путаницы при изображении структур колец приняты общие правила: атомы углерода в кольце изображаются углами, а присоединенные атомы водорода опускают. Смесь хиральных (аномерных*) форм обозначают волнистой линией (рис. 3.9).

Когда атом углерода карбонильной группы вовлечен в образование кольца с получением полуацеталя (в виде пиранозного или фуранозного кольца), он становится хиральным. Для *D*-сахаров конфигурация с гидроксильной группой ниже плоскости кольца (в проекции Хеуорса) является α-формой, и поэтому α-*D*-глюкопираноза — это *D*-глюкоза в пиранозной (шестичленное кольцо) форме в конфигурации с новым хиральным атомом углерода C_1, называемым аномерным атомом углерода альфа (расположенным ниже плоскости кольца). Когда новообразованная гидроксильная группа при C_1 расположена выше плоскости кольца (в проекции Хеуорса), то она находится в β-положении, и такая структура называется β-*D*-глюкопиранозой. Это относится ко всем *D*-сахарам. Для сахаров *L*-ряда действует обратное правило, то есть аномерная гидроксильная группа расположена наверху в α-аномере и внизу — в β-аномере (см. рис. 3.8). Это обусловлено тем, что α-*D*-глюкопираноза и β-*L*-глюкопираноза являются зеркальными отражениями друг друга.

Вместе с тем, пиранозные кольца с присоединенными группами не являются плоскими и вытянуты вверх и вниз, как следует из проекции Хеуорса. Более того, они встречаются в различных формах (конформациях), чаще всего в одной из двух конформаций, названных «кресло» из-за их формы. В конформации кресла одна связь каждого атома углерода проецируется вверх или вниз от плоскости кольца (такие связи называют аксиальными). Другая связь не вовлечена в образование кольца и расположена выше или ниже относительно аксиальных связей, но по отношению к кольцу она расположена на периметре и называется поэтому экваториальным положением (рис. 3.10).

На примере β-*D*-глюкопиранозы видно, что C_2, C_3, C_5 и атом кислорода кольца остаются в плоскости, C_4 располагается несколько выше, а C_1 — несколько ниже (см. рис. 3.10 и 3.11). Такая конформация обозначается $^4C_1$. Обозначение «С» здесь происходит от англ. «*Chair*» (кресло). Верхний индекс указывает, что атом C_4 расположен выше плоскости кольца, а нижний — что атом C_1 расположен ниже его плоскости (существуют две формы кресла — во второй форме ($^1C_4$) аксиальные и экваториальные группы расположены наоборот). В шестичленных кольцах нормальные углы между связями при атомах углерода и кислорода искажены меньше, чем в кольцах с другим количеством звеньев. Когда объемные гидроксильные группы максимально отделены друг от друга конформацией кольца, способствующей расположению большин-

* Аномерами называют α- и β-формы сахаров. Два аномера образуют аномерную пару. — *Примеч. авт.*

ства из них в экваториальных, а не аксиальных положениях, напряжение еще больше снижается. Экваториальное положение энергетически выгодно, и вращение атомов углерода, происходящее на соединяющих их связях, разворачивает объемные группы в экваториальных положениях на максимальное расстояние.

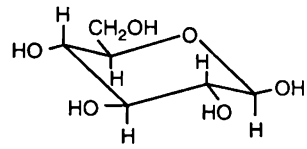


Рис. 3.11. β-*D*-глюкопираноза в конформации $^4C_1$ — все объемные группы находятся в экваториальном положении, а все атомы водорода в аксиальном

Как мы уже отмечали, у β-*D*-глюкопиранозы все гидроксильные группы расположены в экваториальном положении, но каждая из них — несколько выше или ниже его. Это расположение гидроксильных групп β-*D*-глюкопиранозы относительно истинно экваториального положения чередуется (при C_1 несколько выше, при C_2 — несколько ниже и т. д.). Громоздкая гидроксиметильная группа C_6 у гексоз всегда находится в стерически свободном (незатрудненном) экваториальном положении. Если β-*D*-глюкопираноза имеет конформацию $^1C_4$, то все объемные группы будут аксиальными. В $^1C_4$ конформации из-за гораздо более энергетически высокой формы существует лишь небольшая часть молекул *D*-глюкопиранозы.

Если объемные (гидроксильная и гидроксиметильная) группы находятся в экваториальных положениях, то шестичленные кольца сахаров достаточно стабильны. Так, β-*D*-глюкопираноза растворяется в воде с быстрым достижением равновесия форм с открытой цепью и форм с 5-, 6- и 7-членными кольцами. При комнатной температуре преобладает шестичленная (пиранозная) форма, затем следуют пятичленные (фуранозные) формы колец. Конфигурация аномерного атома углерода (C_1 у альдоз) каждого кольца может быть альфа или бета. Равновесное отношение кольцевых форм зависит от конкретного сахара и температуры (примеры распределения кольцевых форм приведены в табл. 3.2).

Таблица 3.2
Равновесное распределение циклической и аномерной форм моносахаридов

Сахар	Пиранозные формы		Фуранозные формы	
	α-конфигурация	β-конфигурация	α-конфигурация	β-конфигурация
Глюкоза	36,2	63,8	0	0
Галактоза	29	64	3	4
Манноза	68,8	31,2	0	0
Арабиноза	60	35,5	2,5	0,5
Рибоза	21,5	58,5	6,5	13,5
Ксилоза	36,5	63	< 1	< 1
Фруктоза	4	75	0	21

Альдегидная форма с открытой цепью составляет лишь около 0,003% от общего количества форм, но из-за быстрых взаимопревращений с кольцевыми формами сахар может быстро реагировать так, словно он полностью находится в свободной альдегидной форме (рис. 3.12).

3.1.3. Гликозиды

Полуацетальная форма сахаров может реагировать со спиртами с образованием полного ацеталя, называемого гликозидом. В лабораторных условиях данная реакция протекает в безводных условиях в присутствии кислоты (в качестве катализатора) и при повышенных температурах, но чаще всего гликозиды образуются в природе в водной среде в ходе реакции, катализируемых ферментами, и по путям, включающим образование ряда промежуточных продуктов реакции (интермедиатов). Ацетальную связь при аномерном атоме углерода обозначают суффиксом «-ид». При реакции *D*-глюкозы с метанолом получается преимущественно метил α-*D*-глюкопиранозид с небольшим количеством β-*D*-глюкопиранозида (рис. 3.13). Образуются также две аномерные формы пятизвенных фуранозидов, но обладая более высокоэнергетической структурой, они реорганизуются в более стабильные формы и в равновесном состоянии представлены в небольших количествах. В этом случае метильная и любая другая группа, связанная с сахаром, называется

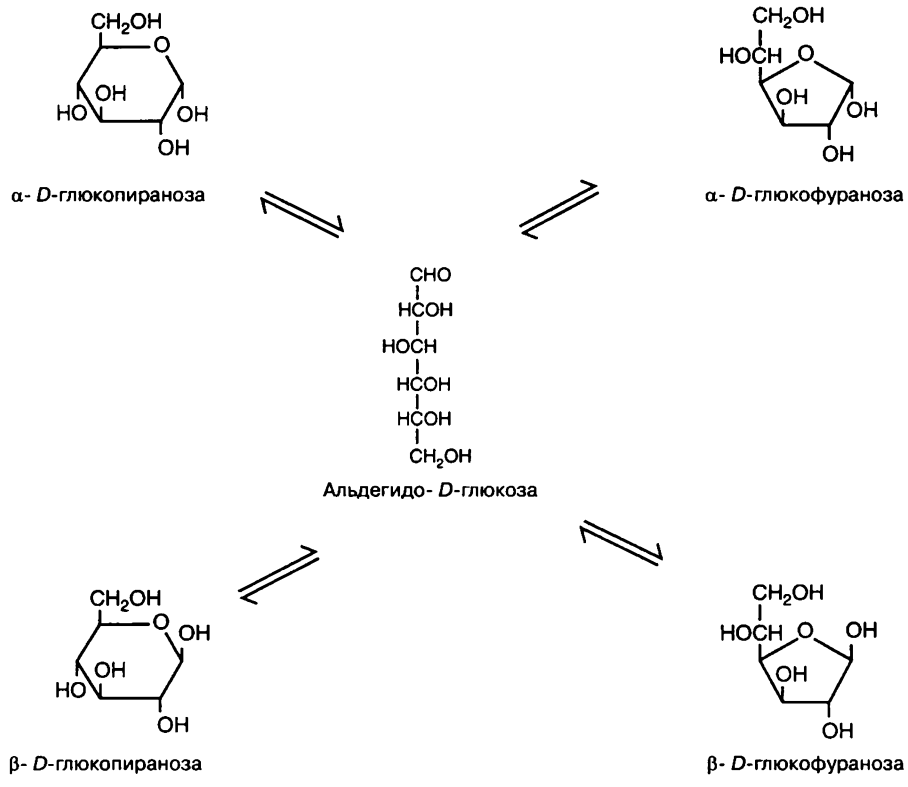


Рис. 3.12. Взаимопревращения ациклической и циклической форм *D*-глюкозы

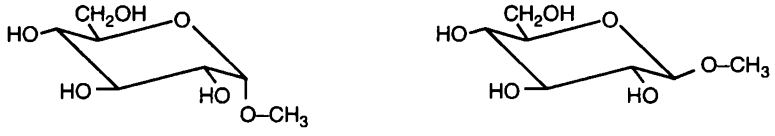


Рис. 3.13. Метил α-*D*-глюкопиранозид (слева) и метил β-*D*-глюкопиранозид (справа)

агликоном. Гликозиды подвергаются гидролизу в кислой среде с образованием редуцирующего сахара (см. раздел 3.1.4.1) и гидроксилированного соединения. При повышении температуры гидролиз ускоряется.

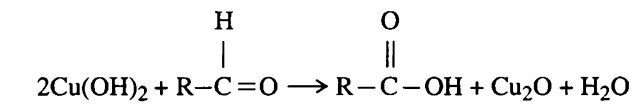
3.1.4. Реакции моносахаридов

Во всех молекулах углеводов имеются доступные для реакции гидроксильные группы. У простых моносахаридов и большинства других молекул углеводов с низкой молекулярной массой имеются также реакционноспособные карбонильные группы. Образование пиранозных и фуранозных колец (циклических полуацеталей) и гликозидов (ацеталей) мы уже рассматривали.

3.1.4.1. Окисление до альдоновых кислот и альдонолактонов

Альдозы быстро окисляются до альдоновых кислот окислением альдегидной группы до карбоксильной или карбоксилатной группы. Эта реакция (3.1) обычно используется для количественного определения сахаров. В одном из ранних методов обнаружения и измерения содержания сахаров использовался реактив Фелинга, представляющий собой щелочной раствор меди (II), который окисляет альдозу до альдоновой кислоты и восстанавливается до меди (I), которая выпадает в осадок в виде Cu_2O кирпично-красного

цвета. Разновидности этого метода (реактивы Шомоди-Нельсона и Бенедикта) до сих пор используют для количественного определения редуцирующих сахаров в пищевых продуктах и других биологических материалах.

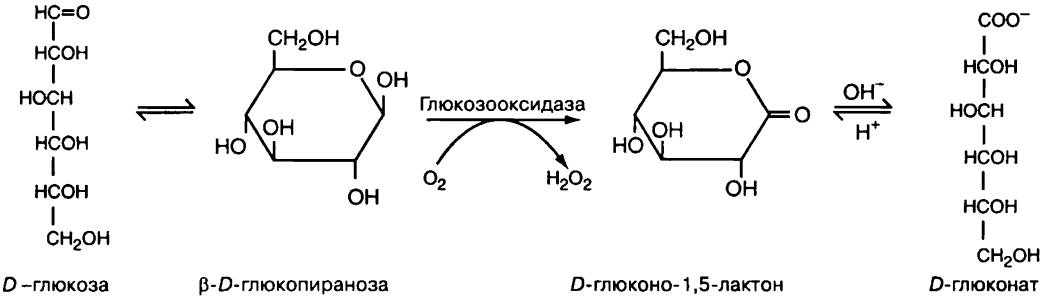


$$2Cu(OH)_2 + R-\underset{\displaystyle H}{\overset{|}{C}}=O \longrightarrow R-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-OH + Cu_2O + H_2O \qquad (3.1)$$

В процессе окисления альдегидной группы альдозы до соли карбоновой кислоты окисляющий агент восстанавливается сахаром, и поэтому альдозы называются редуцирующими (восстанавливающими) сахарами. Редуцирующими сахарами являются и кетозы, поскольку в щелочных условиях теста Фелинга кетозы изомеризуются до альдоз. Реактив Бенедикта реагирует с альдозами, но не с кетозами.

В простом и специфическом методе количественного определения сахаров путем окисления *D*-глюкозы до *D*-глюконовой кислоты используется фермент глюкозооксидаза, 1,5-лактон (внутримолекулярный эфир) этой кислоты (рис. 3.14). Эту реакцию обычно используют для количественного определения *D*-глюкозы в пищевых продуктах и других биологических материалах, в том числе для определения ее содержания в крови и моче. *D*-глюконовая кислота нативно присутствует во фруктовых соках и меде.

Показанная на рис. 3.14 реакция также используется для промышленного производства *D*-глюконовой кислоты и ее лактона. *D*-глюконо-дельта-лактон (ГДЛ) или *D*-глюконо-1,5-лактон (по систематической номенклатуре) за 3 ч при комнатной температуре почти полностью гидролизуется в воде, вызывая снижение значения pH. Его медленный гидролиз, обеспечивающий медленное подкисление и мягкий вкус, делает ГДЛ уникальным подкислителем, который широко применяют в производстве мясных и молочных продуктов, а также замороженного теста (как разрыхлитель).

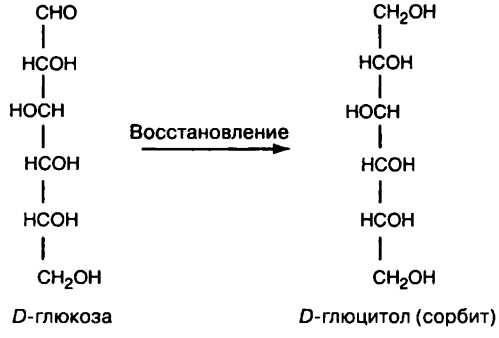


D-глюкоза β-*D*-глюкопираноза *D*-глюконо-1,5-лактон *D*-глюконат

Рис. 3.14. Окисление *D*-глюкозы, катализируемое глюкозооксидазой

3.1.4.2. Восстановление карбонильных групп

Гидрогенизация — это присоединение водорода к двойной связи. Для углеводов это означает присоединение водорода к двойной связи между атомом кислорода и атомом углерода карбонильной группы альдозы или кетозы. Гидрогенизация *D*-глюкозы (рис. 3.15) быстро протекает под действием газообразного водорода под давлением в присутствии катализатора (никеля Ренея). В результате этой реакции образуется *D*-глюцитол, известный под названием сорбит (суффикс «-итол» означает «сахарный спирт», альдитол). Альдитолы называют также полиолами и полигидроксиспиртами. Будучи полученным из гексозы, *D*-глюцитол (сорбит) является гекситолом. Сорбит широко распространен в растениях (от водорослей до высших растений; он обнаружен в ягодах и фруктах, но в небольших количествах). Степень сладости сорбита со-



D-глюкоза *D*-глюцитол (сорбит)

Рис. 3.15. Восстановление *D*-глюкозы

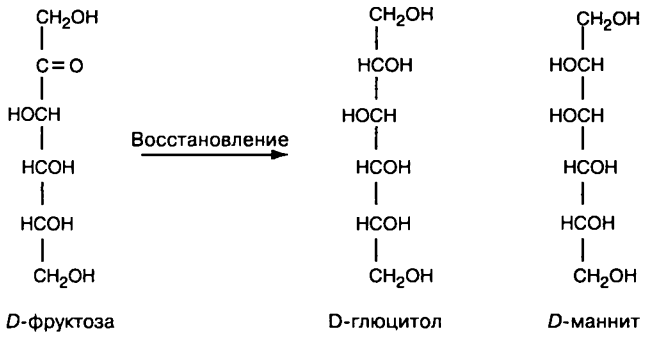


Рис. 3.16. Восстановление *D*-фруктозы

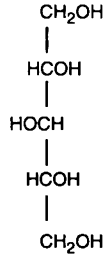


Рис. 3.17. Структурная формула ксилита

ставляет половину сладости сахарозы, реализуется он как в виде сиропа, так и в кристаллической форме. Сорбит используют в качестве увлажняющего агента, то есть для удержания влаги в продукте.

D-маннит можно получить гидрогенизацией *D*-маннозы. Промышленно его получают, как и сорбит, путем гидрогенизации сахарозы. *D*-маннит является продуктом гидрогенизации *D*-фруктозного компонента сахарозы и изомеризации *D*-глюкозы (рис. 3.16), количество которого может регулироваться щелочностью раствора, подвергаемого каталитической гидрогенизации. В отличие от сорбита *D*-маннит не обладает влагоудерживающими свойствами — наоборот, он легко кристаллизуется и характеризуется лишь умеренной растворимостью. Используют *D*-маннит для снижения липкости кондитерских глазурей. Степень сладости *D*-маннита составляет 65% сладости сахарозы, благодаря чему его применяют в производстве шоколадных изделий без сахара, леденцах от кашля, а также мятной, леденцовой и мягкой карамели.

Ксилит (рис. 3.17) получают гидрогенизацией *D*-ксилозы, получаемой из гемицеллюлоз (в основном из березы). Его кристаллы характеризуются высокой отрицательной теплотой растворения, обеспечивающей освежающий эффект в ротовой полости («холодок во рту»), что делает ксилит хорошим ингредиентом мятных конфет и жевательной резинки без сахара. Степень сладости ксилита примерно такая же, как у сахарозы. Ксилит некариесогенен, поскольку он не метаболизируется микробиотой ротовой полости и не образует зубной налет.

3.1.4.3. Уроновые кислоты

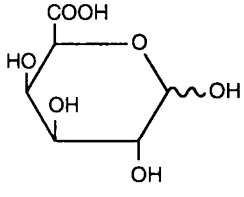


Рис. 3.18. Структурная формула *D*-галактуроновой кислоты

У моносахаридной единицы олиго- или полисахарида концевой атом углерода (с противоположного от альдегидной группы конца углеродной цепи) может встречаться в окисленной форме (в форме карбоновой кислоты). Такую альдогексозу с C_6 в форме карбоновой кислоты называют уроновой кислотой. Если хиральные атомы углерода уроновой кислоты находятся в той же конфигурации, что у *D*-галактозы, то такое соединение называется галактуроновой кислотой (рис. 3.18), являющейся основным компонентом пектина (см. раздел 3.3.13).

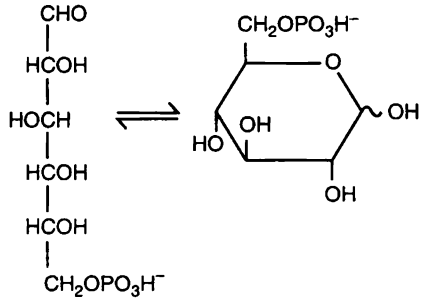
3.1.4.4. Сложные эфиры

Гидроксильные группы углеводов, как и гидроксильные группы простых спиртов, с органическими и некоторыми неорганическими кислотами образуют сложные эфиры. Реакция гидроксильных групп с активированными формами карбоновых кислот (прежде всего с ангидридом карбоновой кислоты) в присутствии соответствующего основания дает эфир (3.2):

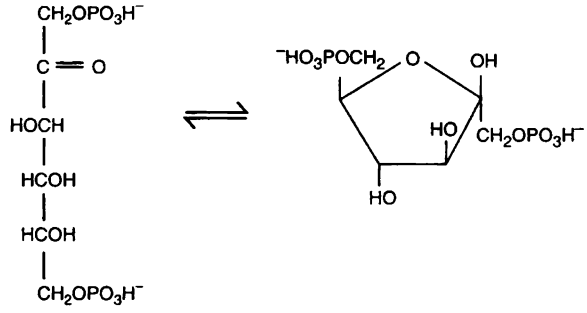
$$ROH + R'-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-R' \text{ или } R'-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-Cl \rightarrow R-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-R' + HO-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-R' \text{ или } HCl \qquad (3.2)$$

В природе встречаются ацетаты, полуэфиры янтарной кислоты (сукцинаты) и другие эфиры углеводных карбоновых кислот. Обнаружены они главным образом как компоненты полисахаридов. Наиболее известными промежуточными продуктами метаболизма являются фосфаты сахаров (рис. 3.19).

Компонентами полисахаридов являются также моноэфиры фосфорной кислоты. Например, в картофельном крахмале содержится довольно мало фосфатных групп, а в кукурузном их еще меньше. При производстве модифицированного пищевого крахмала кукурузный крахмал дериватизируют с помощью моно- или дикрахмальных эфирных групп, или их обеих (см. раздел 3.3.6.10). Другими модифицированными пищевыми крахмалами являются эфиры крахмала — в первую очередь ацетат, сукцинат и замещенные полуэфиры сукцината, а также дикрахмаладипаты (см. раздел 3.3.6.10). Сложные эфиры жирных кислот сахарозы (см. раздел 3.2.3) промышленно получают в виде эмульгаторов эмульсий «вода-в-масле». Полисахариды красных водорослей, в том числе каррагинаны (см. раздел 3.3.10), содержат сульфатную группу (полуэфиры серной кислоты, $R—OSO^-_3$).



D-глюкозо-6-фосфат



D-фруктозо-1,6-дифосфат

Рис. 3.19. Фосфаты сахаров как примеры промежуточных продуктов метаболизма

3.1.4.5. Простые эфиры

Гидроксильные группы углеводов, как и гидроксильные группы простых спиртов, могут образовывать простые и сложные эфиры. Простые эфиры углеводов менее распространены в природе, чем сложные эфиры, однако для изменения их свойств полисахариды промышленно модифицируют. Примерами могут служить промышленное производство метилового ($—O—CH_3$), карбоксиметилового ($—O—CH_2—CO^-{}_2Na^+$) и гидроксипропилового эфиров целлюлозы и гидроксипропиловых эфиров крахмала, каждый из которых разрешен для использования в производстве пищевых продуктов.

Особый тип простого эфира, образующий внутреннюю эфирную связь между 3-м и 6-м атомами углерода *D*-галактозильной единицы (рис. 3.20), обнаружен в полисахаридах красных водорослей, а именно в агаре, фурцеллеране, каппа- и йота-каррагинанах (см. раздел 3.3.10). Такие внутренние эфиры называются 3,6-ангидропроизводными (это название обусловлено тем, что их можно считать продуктами, полученными в результате удаления водных звеньев (HOH) из гидроксильных групп при атомах углерода C_3 и C_6.

Неионные поверхностно-активные вещества (ПАВ) на основе сорбита (*D*-глюцитола) используются в производстве пищевых продуктов в качестве эмульгаторов для эмульсий типа «вода-в-масле» и пеногасителей. Получают их этерификацией сорбита жирными кислотами. Этерификации сопутствует циклодегидратация (в основном первичных гидроксильных групп, C_1 или C_6) таким образом, что углеводная (гидрофильная) часть — это не только сорбит, но и его моно- и диангидриды (циклические эфиры сорбита называют сорбитанами, рис. 3.21), которые называются «эфиры сорбитана». Образующиеся продукты называют моно-, ди- и триэфирами («Спэнами», *Spans*) — обозначение «моно-», «ди-» и «три-» указывает на количество

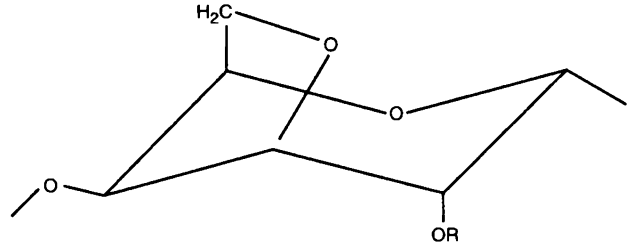


Рис. 3.20. 3,6-ангидро-α-*D*-галактопиранозильная единица полисахаридов красных водорослей

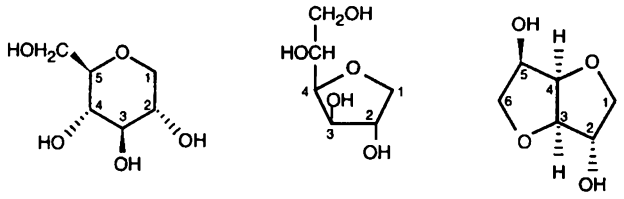


Рис. 3.21. Структурные формулы ангидро-*D*-глюцитолов (сорбитанов). Цифрами обозначены атомы углерода исходной молекулы *D*-глюкозы и сорбита

жирнокислотных групп в сорбитане). Продукт под названием моностеарат сорбитана на самом деле является смесью стеариновых (C_{18}) и пальмитиновых (C_{16}) эфиров сорбита (*D*-глюцитола), 1,5-ангидро-*D*-глюцитола (1,5-сорбитана), 1,4-ангидро-*D*-глюцитола (1,4-сорбитана), обоих внутренних (циклических) эфиров и 1,4:3,6-диангидро-*D*-глюцитола (изосорбита, внутреннего дициклического эфира). Эфиры жирных кислот сорбитана — моностеарат сорбитана, монолаурат сорбитана и моноолеат сорбитана — иногда модифицируют реакцией с этиленоксидом, получая так называемые этоксилированные эфиры сорбитана, известные под торговой маркой «Твины» (*Tweens*). Они представляют собой неионные детергенты, разрешенные Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*FDA*) США к использованию в пищевой промышленности.

3.1.4.6. Неферментативное потемнение

При определенных условиях редуцирующие сахара вызывают потемнение («побурение») изделия, что для некоторых пищевых продуктов представляется желательным и важным, а для других такое потеменение при нагревании или длительном хранении изделий, содержащих редуцирующие сахара, нежелательно [4, 36, 69]. Потемнение пищевых продуктов при нагревании или хранении обычно происходит благодаря химической реакции между редуцирующими сахарами (в основном *D*-глюкозой) и первичной аминогруппой (свободной аминокислоты или аминогруппой боковой цепи молекулы белка). Эта реакция называется реакцией Майяра, а весь процесс — реакцией неферментативного потемнения Майяра (в отличие от более быстрого ферментативного потемнения, катализируемого ферментами и обычно наблюдаемого в свеженарезанных фруктах и овощах типа яблок или картофеля).

При нагревании альдозы или кетозы с аминами протекает ряд реакций с образованием различных соединений (в том числе вкусоароматических веществ и темнокрашенных полимеров) , причем оба реагента исчезают довольно медленно. Эти вкусоароматические вещества и пигменты могут быть как желательными, так и нежелательными. При хранении они образуются медленно, а при жарке или выпекании — гораздо быстрее.

Редуцирующие сахара обратимо реагируют с амином с образованием оснований Шиффа (иминов, RHC = NHR′), способных циклизоваться тем же способом, что и альдоза, с образованием глюкозиламина (иногда его называют N-гликозидом, рис. 3.22). Основание Шиффа подвергается реакции, называемой перегруппировкой Амадори, в результате получается, как и в случае с *D*-глюкозой, производное 1-амино-1-деокси-*D*-фруктозы (называемое продуктом перегруппировки Амадори, который образуется на ранней стадии реакции неферментативного потеменения).

Продукты перегруппировки Амадори трансформируются четырьмя известными путями, которые начинаются с четырех различных промежуточных продуктов. В результате образуется сложная смесь промежуточных и конечных продуктов. Три из четырех промежуточных продуктов, полученных в ходе перегруппировки и элиминирования, — это 1-, 3- и 4-деоксидикарбонильные соединения, известные как 1-, 3- и 4-деоксиозоны. Их образование идет быстрее всего при значениях pH 4–7, причем преобладающим является 3-деоксиозон (его правильнее называть 3-деоксигексулоза, рис. 3.23).

Деоксиозоны могут циклизоваться так же, как альдозы и кетозы. Они также будут дегидратироваться, особенно при высоких температурах. Реакция продолжается (особенно при значениях pH 5 и ниже) с образованием дегидратируемого промежуточного продукта. В результате из гексозы образуется производное фурана — 5-гидроксиметил-2-фуральдегид, общеизвестный как гидроксиметилфурфурол (ГМФ) (см. рис. 3.23), а из пентозы — фурфурол (фуральдегид). В менее кислых условиях (pH > 5) реакционноспособные циклические соединения (ГМФ, фурфурол и др.) и соединения с аминогруппами полимеризуются до темного азотсодержащего нерастворимого вещества, называемого меланоидином. Аминокислоты и фураны (фурфурол и/или ГМФ) почти всегда содержатся в готовых полимерных продуктах. Цвет конкретных

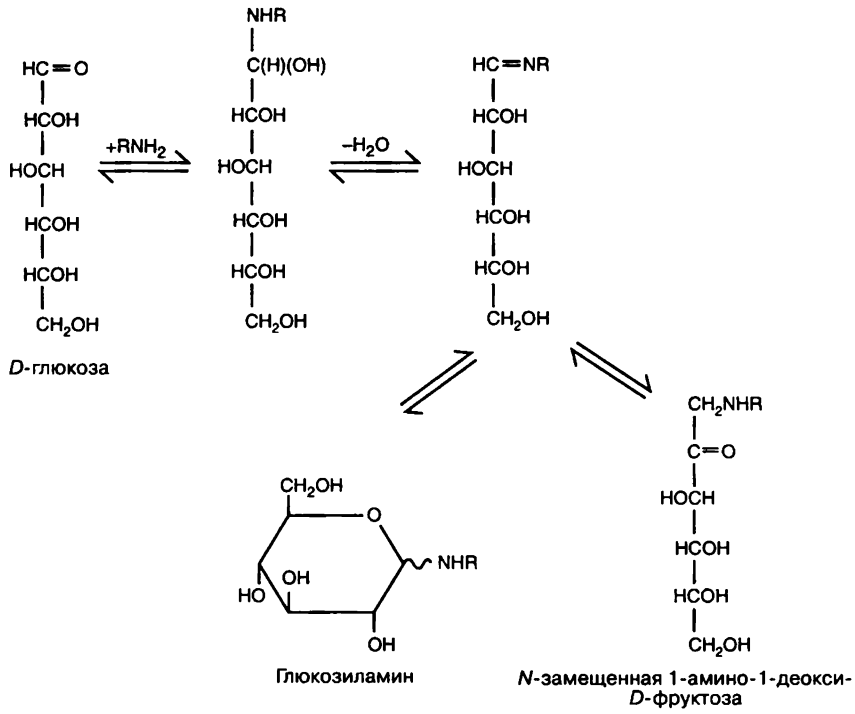


Рис. 3.22. Продукты реакции *D*-глюкозы с первичным амином (RNH_2)

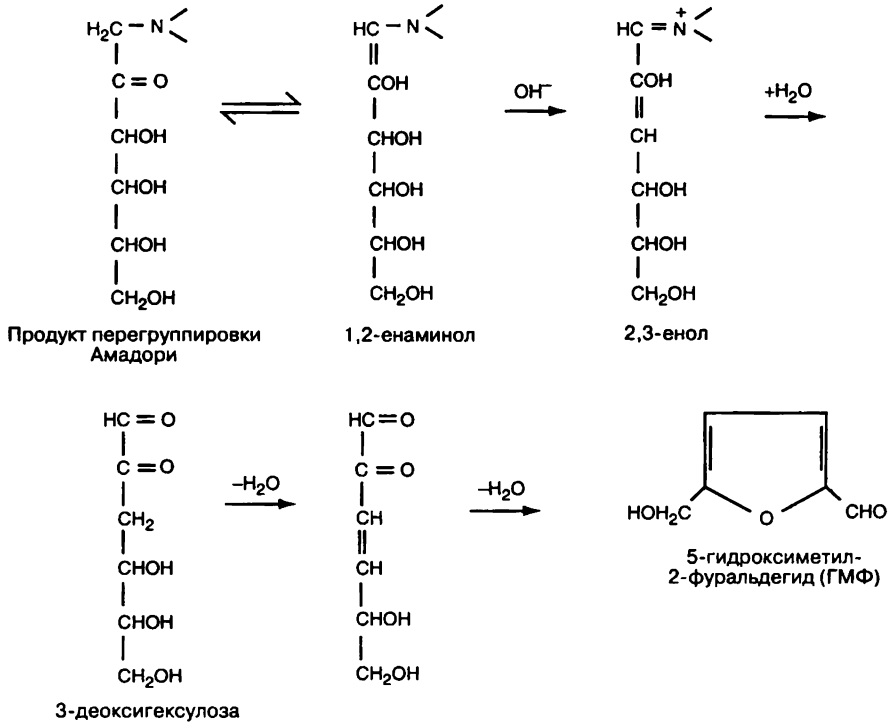


Рис. 3.23. Превращение продукта перегруппировки Амадори в ГМФ

меланоидинсодержащих полимеров варьирует от коричневого до черного, у них также разные молекулярная масса, содержание азота и растворимость.

При наличии более высокого содержания веществ с первичными аминогруппами (например, белков с высоким содержанием *L*-лизина) основными продуктами реакции являются пирролы (соединения, в которых атом кислорода в кольце ГМФ или фурфурола замещен группой N—R).

Мальтит и изомальтит, которые участвуют в формировании вкуса и аромата хлебной корочки, образуются из 1-деоксиозона (рис. 3.24).

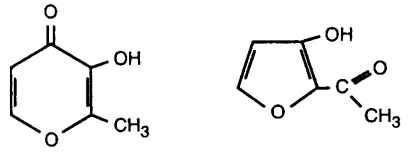
Промежуточные продукты образования меланоидина называются редуктонами и также получаются из 1-деоксиозонов. Редуктоны обладают антиоксидантными свойствами. Поскольку редуктоны участвуют в окислительно-восстановительных (редокс-) реакциях, из них могут образовываться и другие промежуточные продукты (рис. 3.25).

Озоны расщепляются или между двумя карбонильными группами, или со стороны ендиола (—COH=COH—), образуя соединения с более короткой цепью (в первую очередь альдегиды), которые могут вступать в различные реакции. Еще одна важная реакция дикарбонильных соединений (озонов и деоксиозонов) — это расщепление по Штрекеру. Реакция одного из этих соединений с α-аминокислотой (R— $CHNH_2$—CO_2H) сначала приводит к образованию основания Шиффа, а затем к декарбоксилированию (выделению CO_2), дегидратации и элиминированию с образованием альдегида, имеющего на один атом углерода меньше, чем в исходной аминокислоте. Полученные из аминокислот альдегиды — зачастую главные компоненты аромата при неферментивном потемнении. К важнейшим вкусоароматическим соединениям, получаемым этим путем, следует отнести 3-метилтиопропаналь (метиональ, CH_3—S—CH_2—CH_2 —CHO) из *L*-метионина, фенилацетальдегид (Ph—CH_2—CHO) из *L*-фенилаланина, метилпропаналь ($(CH_3)_2$—CH—CHO) из *L*-валина, 3-метилбутаналь ($(CH3)_2$—CH—CH_2—CHO) из *L*-лейцина и 2-метилбутаналь из *L*-изолейцина.

Образуется ряд окрашенных веществ под общим названием «меланоидины», разнообразие которых зависит от количества промежуточных продуктов и возможных реакций конденсации. Некоторые из них содержат азот, некоторые — только углерод, водород и кислород, но во всех имеются ароматические кольца и сопряженные двойные связи.

К другим продуктам реакции Майяра относятся модифицированные белки. Модификация белков — это в первую очередь результат их реакции (особенно реакции их боковых цепей *L*-лизина и *L*-аргинина) с соединениями, содержащими карбонильные группы (редуцирующими сахарами, озонами, фурфуролом, ГМФ и производными пиррола). Например, реакция ε-аминогруппы *L*-лизинового звена в молекуле белка после перегруппировки Амадори превращает *L*-лизиновое звено в звено N-фруктофуранозиллизина. Последующие реакции приводят к образованию замещенных колец фурана и пиррола, образованных из фруктофуранозильного звена и присоединенных к молекуле белка. Такие реакции разрушают аминокислоту, а так как *L*-лизин — это незаменимая (эссенциальная) аминокислота, то ее разрушение снижает пищевую ценность продукта. В обычных жареных и выпекаемых продуктах потери лизина и аргинина составляют 15—40%.

Смесь образующихся продуктов реакций зависит от температуры, продолжительности, значения pH, природы редуцирующего сахара и аминосоединения. Это обусловлено тем, что различные сахара подвергаются неферментативному потемнению с разной скоростью. Например, *D*-глюкоза подвергается реакции потемнения быстрее *D*-фруктозы. Вторичные амины дают иные продукты реакции, чем первичные.



Мальтит Изомальтит

Рис. 3.24. Структурные формулы мальтита и изомальтита

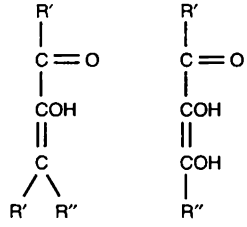


Рис. 3.25. Два примера нескольких типов структур редуктонов

Так как у этой реакции относительно высокая энергия активации, то всегда необходимо нагревание. Скорость реакции Майяра зависит от значения активности воды (a_w) пищевого продукта и максимальна при a_w 0,6–0,7. Для некоторых видов продуктов степень неферментативного потемнения может регулироваться путем контроля активности воды, а также концентрации реагентов, продолжительности воздействия, температуры и значения pH. Диоксид серы и бисульфитные ионы реагируют с альдегидными группами с образованием продуктов присоединения, ингибирующих реакцию Майяра путем удаления по крайней мере одного реагента (редуцирующего сахара, ГМФ, фурфурола, и т. д.). Цвет, вкус и аромат пищевых продуктов зависят от смеси продуктов реакции. Можно выделить следующие параметры, которые можно контролировать для увеличения или уменьшения степени неферментативного потемнения:

температура (скорость реакции уменьшается при понижении температуры) и время пребывания продукта при этой температуре;

значение pH (скорость реакции при снижении pH уменьшается);

содержание влаги (максимальная скорость реакции наблюдается при активности воды 0,6–0,7 и содержании влаги около 30%);

вид редуцирующего сахара;

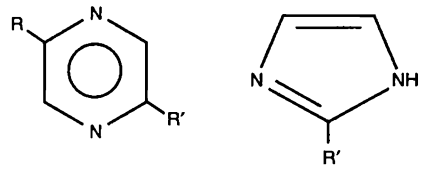
присутствие ионов переходных металлов, подвергающихся одноэлектронному окислению в энергетически выгодных условиях, например, ионов Fe (II) и Cu (I) (к концу процесса пигментообразования может включаться свободнорадикальная реакция).

После совместного нагревания редуцирующих сахаров и аминокислот, белков, и/или других азотсодержащих соединений (например, в соевом соусе или корочке хлеба) обнаруживаются продукты реакции Майяра, в том числе растворимые и нерастворимые полимеры. В хлебопечении и производстве мучных кондитерских изделий, а также при жарке мяса желательно потемнение корочки до коричневого цвета. Летучие соединения, образующиеся в реакции неферментативного потемнения при выпекании и жарке, зачастую обеспечивают требуемый вкус и аромат. Продукты реакции Майяра являются также необходимыми вкусоароматическими компонентами молока, шоколадных изделий, карамели, ириса и помадок, при производстве которых редуцирующие сахара реагируют с молочными белками. В ходе реакции Майяра также образуются вкусоароматические соединения, особенно горькие, желательные, например, для кофе. С другой стороны, реакция Майяра может привести к образованию посторонних привкусов и запахов. Наиболее вероятно их появление при пастеризации, хранении сухих продуктов и жарке мяса или рыбы на гриле. Для неферментивного потемнения общим требованием является нагревание влагосодержащих пищевых продуктов.

3.1.4.7. Карамелизация

Нагревание углеводов, в частности, сахарозы (см. раздел 3.2.3) и редуцирующих сахаров в отсутствие азотсодержащих соединений вызывает сложную группу реакций, вовлеченных в процесс карамелизации [4, 59]. Эта реакция ускоряется в присутствии небольших количеств кислот и некоторых солей. Несмотря на то что в ней не участвуют аминокислоты или белки, реакция карамелизации аналогична неферментативному потемнению. В конечном продукте (карамели), как при реакции Майяра, образуется сложная смесь полимерных веществ, сформированных из ненасыщенных циклических (пяти- и шестизвенных) соединений. Как и при реакции Майяра, образуются промежуточные продукты типа 3-деоксиозонов и фуранов. Ненасыщенные циклические звенья конденсируются с образованием полезных полимеров коричневого цвета с сопряженными двойными связями. Эта реакция ускоряется катализаторами, которые используют для получения карамели требуемых цвета, растворимости и кислотности.

Карамели промышленно производятся в качестве как красящих, так и и ароматобразующих веществ. Получают карамель путем нагревания чистого углевода или в присутствии кислоты, основания или соли. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу, но можно карамелизовать *D*-фруктозу, *D*-глюкозу (декстрозу), инвертный сахар, глюкозный и мальтитный сиропы, а также мелассу. Из кислот допускается использование серной, сернистой, фосфорной, уксусной и лимонной кислот пищевой степени чистоты. К используемым основаниям относятся гидроксиды аммония, натрия, калия и кальция, а к солям — карбонаты аммония, натрия и калия, бикарбонаты, фосфаты (одно- и двухосновные), сульфаты и бисуль-



Производное пиразина Производное имидазола

Рис. 3.26. Производные пиразина (слева) и имидазола (справа), образующиеся при карамелизации в присутствии аммиака R = —CH_2—(CHOH)$_2$—CH_2OH, R′ = —(CHOH)$_3$—CH_2OH

фиты. Таким образом, в производстве карамели существует большой набор переменных, включая температуру. В результате реакции аммиака с промежуточными продуктами реакции карамелизации (3-деоксиозонами, полученными термолизом) получаются производные пиразина и имидазола (рис. 3.26).

Существует четыре класса карамельных (сахарных) колеров. Карамельный колер I (E150*a*, также называемый «простым») получают нагреванием углеводов без источников ионов аммония или сульфита (могут использоваться кислоты и щелочи). Карамельный колер II (E150*b*, полученный по щелочно-сульфитной технологии) получают нагреванием углевода в присутствии сульфита, но в отсутствие ионов аммония (могут использоваться кислоты и щелочи). Такой колер, используемый в производстве пива и алкогольных напитков для придания им красновато-коричневого цвета, содержит коллоидные частицы с небольшим отрицательным зарядом и в растворе дает значение pH 3–4. Карамельный колер III (E150*c*, полученный по аммиачной технологии) получают нагреванием углевода в присутствии источника аммониевых ионов, но в отсутствие сульфитных ионов (могут использоваться кислоты и щелочи). Этот колер используют в производстве хлебобулочных и мучных кондитерских изделий, сиропов и пудингов для придания им красновато-коричневого цвета. Он содержит положительно заряженные коллоидные частицы и дает раствор со значением pH 4,2–4,8. Карамельный колер IV (E150*d*, полученный по аммиачно-сульфитной технологии) получают нагреванием углевода в присутствии как сульфитных, так и аммониевых ионов (могут использоваться кислоты и щелочи). Этот колер используют в производстве безалкогольных напитков на основе колы, других кислых напитков, выпечных изделий, сиропов, конфет, кормов для животных и сухих приправ для придания им коричневого цвета. Он содержит отрицательно заряженные коллоидные частицы и дает раствор со значением pH 2–4,5. В этом случае кислая соль катализирует расщепление гликозидной связи сахарозы, и аммониевый ион участвует в перегруппировке Амадори. Пигменты в этих четырех типах карамельного колера представляют собой крупные полимерные молекулы с различной сложной, до конца еще не выясненной, структурой. Именно эти полимеры и образуют коллоидные частицы. Скорость их образования возрастает при повышении температуры и значения pH. Естественно, карамелизация может происходить и при кулинарной обработке, особенно в присутствии сахара. В производстве шоколада и фаджа реакция карамелизации протекает параллельно реакции неферментативного потемнения.

3.1.4.8. Образование акриламида

Реакция Майяра предполагает образование акриламида во многих видах пищевых продуктов, нагреваемых до высоких температур в процессе их переработки или кулинарной обработки [3, 18, 50, 70, 73]. Для разных видов пищевых продуктов, в ходе производства которых использовалась жарка во фритюре, выпечка, взрывание в вакууме, обжарка и другие высокотемпературные технологии, содержание акриламида составляет обычно менее 1,5 мг/кг (табл. 3.3). В вареных и ненагреваемых блюдах акриламид не выявлен (при варке картофеля, например, температура не превышает 100 °C). Акриламид не обнаружен или выявлен в очень небольших количествах в консервированных или замороженных фруктах, овощах и овощных белковых продуктах, в частности, в «вегетарианских» бургерах и родственных им продуктах за исключением зрелых оливок без косточек, в которых содержание акриламида варьирует от 0 до 1925 мкг/кг. Акриламид — это известное нейротоксичное вещество, обладающее, по всей вероятности, слабым канцерогенным действием при потреблении его в количествах, значительно превышающих его содержание в пищевых продуках.

Акриламид образуется в основном в ходе реакции второго порядка между редуцирующими сахарами (карбонильная часть) и α-аминогруппой свободного *L*-аспарагина (рис. 3.27).

Эта реакция требует присутствия обоих субстратов. Образование акриламида может происходить в таких блюдах из жареного картофеля, как чипсы и картофель фри, поскольку в картофеле содержится как *D*-глюкоза, так и свободный *L*-аспарагин. Наиболее вероятно протекание данной реакции через про-

Таблица 3.3

Содержание акриламида в некоторых пищевых продуктах по данным Центра безопасности пищевых продуктов и прикладной нутрициологии Министерства сельского хозяйства США

Продукт	Содержание акриламида*, мкг/кг
Миндаль жареный	236–457
Булочки из высокобелковой муки	0–343
Хлебобулочные изделия	0–364
Зерновые завтраки, готовые к употреблению	34–1057
Какао	0–909
Кофе не ферментированный	3–374
Кофе с цикорием	380–609
Печенье	36–432
Крекеры и аналогичные МКИ	26–1540
Картофель фри	20–1325
Картофельные чипсы	117–196**
Претцели	46–386
Тортильи	10–33
Чипсы из кукурузной муки	117–196

* Экстремальные значения, особенно из верхнего диапазона, обычно вывявляются лишь в небольшом числе образцов.

** В одном из образцов сладких картофельных чипсов содержалось 4080 мкг акриламида/кг.

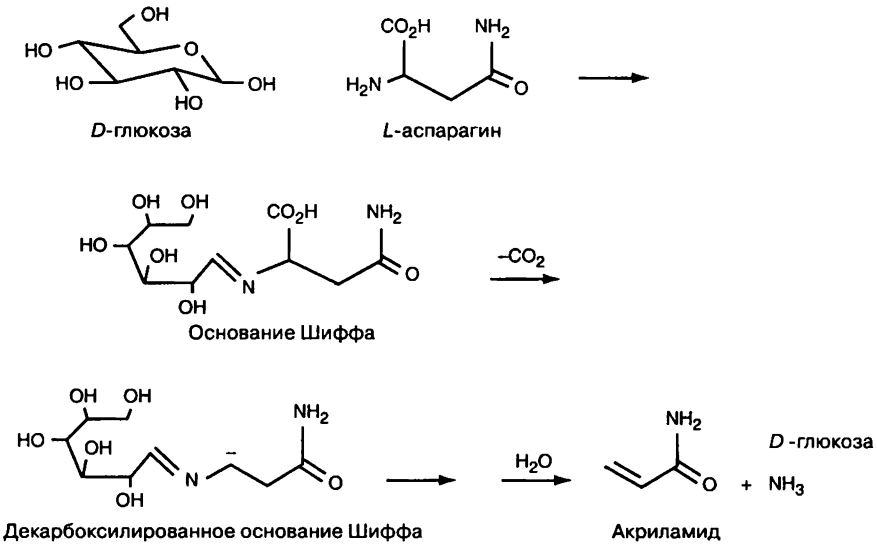


Рис. 3.27. Предполагаемый механизм образования акриламида в пищевых продуктах

межуточный продукт — основание Шиффа, которое затем декарбоксилируется через разрыв углерод-углеродных связей с образованием акриламида (известно, что источником его атомов является исключительно *L*-аспарагин). Хотя акриламид представляет собой нежелательный продукт этой сложной последовательности реакций (эффективность реакции составляет около 0,1%), он способен накапливаться до обнаруживаемых уровней в пищевых продуктах, подвергаемых длительному воздействию высоких температур. Для образования акриламида требуются температуры не менее 120 °С, что означает невозможность его образования в продуктах с высоким содержанием влаги, а кинетически оно выгодно при повышении температуры до 200 °С. При длительном нагревании при температурах выше 200 °С содержание акриламида может снижаться за счет реакций термического элиминирования или разложения.

Кроме того, содержание акриламида в пищевых продуктах зависит от значения pH (он образуется при pH 4–8). Считается, что пониженное образование акриламида в кислой среде обусловлено протонированием α-аминогруппы аспарагина, что снижает его нуклеофильность. Более того, акриламид подвергается ускоренному термическому разложению при снижении значения pH. На последних стадиях длительного нагревания пищевых продуктов содержание акриламида быстро возрастает, поскольку вода с поверхности продукта быстро испаряется и поверхность нагревается до температур выше 120 °C. Продукты с большой площадью поверхности типа картофельных чипсов содержат максимальное содержание акриламида, так как относятся к продуктам высокотемпературной обработки. Дополнительным фактором, делающим возможным образование акриламида из субстратов реакции при высоких температурах, является нагреваемая площадь поверхности продукта.

Попытки минизировать образование акриламида в пищевых продуктах можно свести к трем стратегиям:

удаление одного или обоих субстратов;

изменение условий переработки;

удаление акриламида из продукта уже после его образования.

Бланшированием или вымачиванием в воде за счет удаления субстратов реакции (уменьшение содержания сахаров и свободного аспарагина) можно обеспечить 60%-ное снижение содержания акриламида. Показано, что уменьшить образование акриламида можно путем модификации реагентов (например, протонирования аспарагина путем снижения pH или его превращения в аспарагиновую кислоту аспарагиназой), добавления конкурирующих субстратов, не образующих акриламид (например, аминокислот, отличных от аспарагина или белка), и внесения солей, уменьшающих образование акриламида. Полезными для минимизации образования акриламида могут также стать улучшение контроля и оптимизация условий тепловой обработки (соотношения температуры и продолжительности). Вполне возможно, что для эффективного сокращения образования акриламида в пищевых продуктах потребуется наряду с уже используемыми способами, их комбинация в зависимости от особенностей данной пищевой системы. Несмотря на то что до сих пор не выявлены связи между потреблением акриламида с пищей и риском онкологических заболеваний, необходимо продолжать изучение его долгосрочной канцерогенности, мутагенности и нейротоксичности, как и попытки уменьшить образование акриламида в процессе переработки и кулинарной обработки пищевых продуктов.

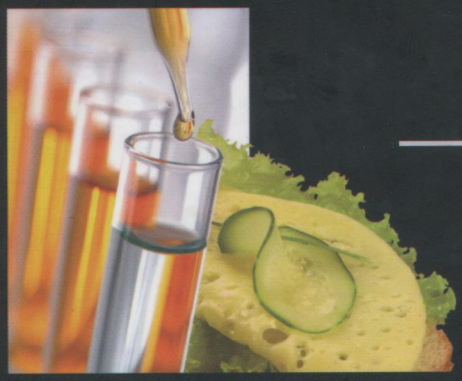
3.2. Олигосахариды

Олигосахариды содержат от 2 до 10 или до 20 сахарных звеньев в зависимости от позиции автора определения этого термина, основанного на наличии гликозидных связей. Если молекула содержит более 20 звеньев, это уже полисахарид. Дисахариды — это гликозиды, моносахаридным звеном является агликон, а трисахариды — соединение с тремя моносахаридными звеньями. Структуры, содержащие от 4 до 10 гликозильных звеньев, независимо от их линейности или разветвленности, называют соответственно тетра-, пента-, гекса-, гепта-, окта-, нона- и декасахаридами и т. д. В природе встречаются лишь немногие олигосахариды. Большая их часть получается гидролизом полисахаридов до соединений с меньшим числом звеньев. Поскольку гликозидные связи являются частью ацетальных структур, они подвергаются кислотно-катализируемому гидролизу при нагреве в присутствии водных растворов кислот.

3.2.1. Мальтоза

Примером дисахарида может служить мальтоза (рис. 3.28). В редуцирующем концевом звене (обычно изображаемом справа) имеется потенциально свободная альдегидная группа, и в растворе она будет в равновесии с альфа- и бета-шестизвенными циклическими формами (аналогично уже рассматривавшимся ранее моносахаридам). Так как О-4 заблокирован присоединением второго *D*-глюкопиранозильного звена, фуранозное кольцо образоваться не может. Мальтоза — это редуцирующий сахар, и альдегидная группа может взаимодействовать с окислителями и фактически подвергаться всем реакциям, как если бы она была свободной альдозой.

Мальтозу получают гидролизом крахмала с использованием фермента β-амилазы (см. раздел 3.3.6.9). В природе она встречается довольно редко и только в растениях в результате частичного гидролиза крах-



Шринивасан Дамодаран,
Кирк Л. Паркин,
Оуэн Р. Феннема (ред.-сост.)

ХИМИЯ пищевых продуктов

Предлагаемый читателям перевод одного из наиболее авторитетных справочников по химии пищевых продуктов состоит из трех частей
- *Основные компоненты пищи,*
- *Минорные компоненты пищи,*
- *Пищевые системы.*

В первой части рассмотрены вода и лед, углеводы, липиды, аминокислоты и белки, а также ферменты.

Во второй части описаны физико-химические свойства витаминов, минеральных веществ, пищевых красителей, вкусоароматических веществ, пищевых добавок, технологических вспомогательных средств, а также биоактивных веществ.

Третья часть посвящена взаимодействию компонентов пищевых систем, дисперсным пищевым системам, молоку, биохимии и физиологии мышечных и растительных тканей, а также применению биотехнологий в производстве пищевого сырья и продуктов, в том числе генно-модифицированных.

Этот фундаментальный труд, зачастую называемый «Пищевая химия Феннема», переиздается в США каждые 10 лет с включением в текст последних достижений химии и пищевой науки. Русский перевод этой книги, выполненный под научной редакцией специалистов ФБГУ «Институт питания» РАМН, должен способствовать углублению понимания отечественными специалистами основных химических и физических процессов, происходящих в пищевом сырье и готовых продуктах, а также может служить полезным учебно-справочным пособием для студентов, аспирантов и преподавателей профильных вузов.

9 785904 757243

мала. Образуется мальтоза при солодоращении, особенно ячменя, а промышленно ее получают путем специфического ферментативного гидролиза крахмала с использованием β-амилазы, продуцируемой некоторыми штаммами *Bacillus,* хотя можно использовать β-амилазы ячменного зерна, сои и батата. Мальтозу иногда используют в качестве подсластителя. Мальтоза восстанавливается до альдитола мальтита, используемого в производстве шоколада без сахара.

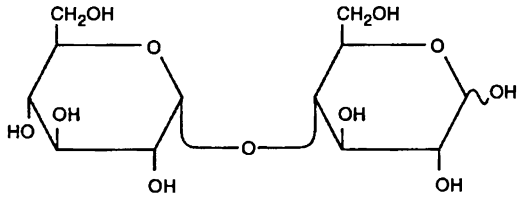


Рис. 3.28. Стрктурная формула мальтозы

3.2.2. Лактоза

Дисахарид лактоза (рис. 3.29) встречается в молоке в основном в свободном состоянии, и в меньшем количестве — как компонент высших олигосахаридов. Содержание лактозы в молоке зависит от вида и породы млекопитающих и составляет от 2,0 до 8,5%. В коровьем и козьем молоке содержится 4,5–4,8% лактозы, а в грудном молоке — около 7%. Лактоза — это главный углевод, необходимый для роста и развития всех млекопитающих. У человека лактоза обеспечивает 40% энергии, потребляемой в период кормления новорожденных и грудных детей. Использованию лактозы как источника энергии должен предшествовать ее гидролиз до составляющих ее моносахаридов (*D*-глюкозы и *D*-галактозы), так как в тонкой кишке всасываются только моносахариды.

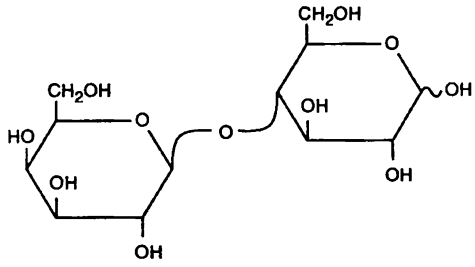


Рис. 3.29. Структурная формула лактозы

В молоке содержится также 0,3–0,6% лактозосодержащих олигосахаридов, многие из которых необходимы для роста и размножения особого штамма *Lactobacillus bifidus,* доминирующего микроорганизма кишечной микробиоты грудных детей.

Лактоза потребляется с молоком и другими неферментированными молочными продуктами типа мороженого. Кисломолочные продукты, в частности большинство йогуртов и сыров, содержат меньше лактозы, поскольку при сквашивании часть лактозы превращается в молочную кислоту. Лактоза стимулирует всасывание в кишечнике и усвоение кальция. Лактоза не усваивается, пока она не достигнет тонкой кишки, в которой присутствует гидролитический фермент лактаза. Лактаза (β-галактозидаза) — это связанный с клеточной мембраной фермент, присутствующий в ворсинчатых граничных эпителиальных клетках тонкой кишки и катализирующий гидролиз лактозы до составляющих ее *D*-глюкозы и *D*-галактозы, которые быстро всасываются и попадают в кровяное русло:

$$\text{Лактоза} \xrightarrow{\text{лактаза}} D\text{-глюкоза} + D\text{-галактоза} \qquad (3.3)$$

Если по какой-либо причине усвоенная лактоза гидролизуется только частично или вообще не гидролизуется, возникает клинический синдром, называемый непереносимостью лактозы. При дефиците лактазы остаточная лактоза остается в просвете тонкой кишки, что вызывает приток жидкости в просвет под действием осмоса. Эта жидкость вызывает вздутие живота и судороги. Из тонкой кишки лактоза поступает в толстый кишечник, где подвергается ферментации анаэробными микроорганизмами до молочной кислоты в виде лактат-аниона (рис. 3.30) и других низкомолекулярных кислот. Повышение концентрации и (иными словами) увеличение осмотического давления приводит к еще большему удержанию жидкости. Кроме того, кислые продукты брожения снижают значение pH и раздражают выстилающую стенку толстого кишечника, что приводит к усиленному продвижению содержимого кишечника (диарея вызывается именно удержанием жидкости и усиленным продвижением содержимого кишечника). Газообразные продукты брожения приводят к вздутию живота и болям.

Непереносимость лактозы у детей редко наблюдается до 6-летнего возраста, после чего частота встречаемости непереносимости лактозы начинает расти и повышается в течение жизни. Наибольшая вероятность ее проявления характерна для взрослых. Частота встречаемости и степень непереносимости лактозы

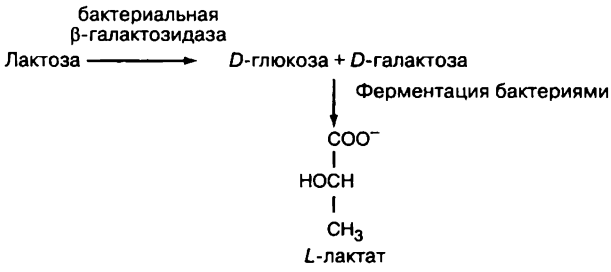


Рис. 3.30. Метаболизм лактозы в толстом кишечнике у лиц с дефицитом лактазы

у разных этнических групп различны, что свидетельствует о генетической обусловленности наличия или отсутствия лактазы в организме.

Известны три пути преодоления дефицита лактазы. Согласно первому пути лактозу удаляют сквашиванием (ферментацией), как в кисломолочных продуктах. Другой путь — это производство молока с пониженным содержанием лактозы путем внесения в него лактазы, но поскольку оба продукта гидролиза (*D*-глюкоза и *D*-галактоза) слаще лактозы, то при степени гидролиза около 80% становится заметным изменение вкуса. Поэтому в большей части молока с пониженным содержанием лактозы ее содержание близко к заданному нормативными документами (70%). Третий путь — это прием β-галактозидазы при употреблении молочных продуктов людьми с дефицитом лактазы.

3.2.3. Сахароза

Если общее количество используемой в США сахарозы (обычно называемой «сахар» или «столовый сахар») поделить на численность населения, то получится, что ее среднедушевое суточное потребление составляет около 160 г. При этом следует учитывать, что сахароза широко используется в бродильных производствах, в хлебобулочных и мучных кондитерских изделиях, в кормах для животных, так что реальное среднесуточное потребление сахарозы с пищевыми продуктами и напитками гораздо меньше и составляет около 55 г, то есть около 20 кг/год [40, 46]. Сахароза состоит из α-*D*-глюкопиранозильного и β-D-фруктопиранозильного звеньев, соединенных «голова к голове» («редуцирующий конец к редуцирующему концу»), а не «голова к хвосту» (рис. 3.31). Так как у нее нет редуцирующего конца, то сахарозу относят к нередуцирующим сахарам.

Два основных промышленных источника сахарозы — это сахарный тростник и сахарная свекла. В экстракте сахарной свеклы также содержатся раффиноза (трисахарид) с *D*-галактопиранозильным звеном, присоединенным к сахарозе, и стахиоза (тетрасахарид), содержащая другое *D*-галактозильное звено (рис. 3.32). Эти олигосахариды, обнаруженные также в бобовых культурах, не усваиваются. Они вместе с другими не полностью расщепляемыми на моносахариды кишечными ферментами не всасываются и попадают в толстую кишку, где они метабилизируются микроорганизмами с образованием лактата и газа. В результате возникает диарея, вздутие живата и метеоризм.

Сахароза характеризуется специфическим вращением плоскости поляризации (+66,5°). Эквимолярная смесь *D*-глюкозы и *D*-фруктозы, полученная гидролизом гликозидной связи, соединяющей две моноса-

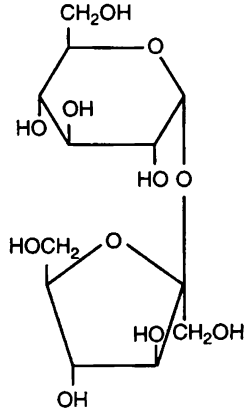


Рис. 3.31. Структурная формула сахарозы

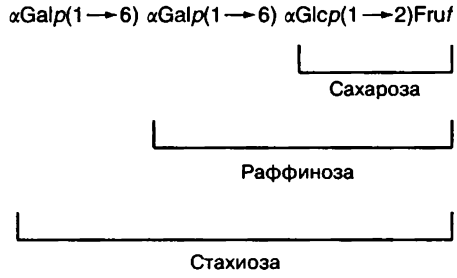


Рис. 3.32. Сахароза, раффиноза и стахиоза (пояснение условных обозначений см в тексте раздела 3.3.1)

харидные единицы, имеет специфическое вращение плоскости поляризации −33,3° Обнаружившие это ученые назвали этот процесс инверсией, а продукт — инвертным сахаром.

Сахароза и большинство других низкомолекулярных углеводов (моносахаридов, альдитолов, дисахаридов и других олигосахаридов с низкой молекулярной массой) из-за их большой гидрофильности и растворимости образуют высококонцентрированные растворы с высокой осмоляльностью.

Например, такие растворы, как мед, не нуждаются в консервантах и могут использоваться не только как подслащивающие вещества (хотя не все углеводные сиропы обладают достаточной степень сладости), но и в качестве консервантов и влагоудерживающих агентов.

В любом растворе углевода часть воды не замораживается. При кристаллизации невымороженной воды, то есть при образовании льда, концентрация раствора в оставшейся жидкой фазе увеличивается, а точка замерзания понижается, что приводит к постепенному увеличению вязкости остаточного раствора. В итоге жидкая фаза затвердевает, как стекло, подвижность молекул ограничивается, а обусловленные диффузией реакции замедляются (см. главу 2). Из-за ограничения подвижности молекулы воды становятся незамораживаемыми, то есть они не могут образовывать кристаллы. Таким образом, углеводы действуют как своего рода криопротекторы и защищают продукт от дегидратации, которая разрушает структуру и текстуру, образованную замораживанием.

Фермент сахараза в кишечном тракте человека катализирует гидролиз сахарозы на *D*-глюкозу и *D*-фруктозу, что делает сахарозу одним из трех углеводов, усваиваемых человеком и используемых в качестве источника энергии (другие два углевода — это лактоза и крахмал). Моносахариды (*D*-глюкоза и *D*-фруктоза) обладают большой пищевой ценностью и не нуждаются в преобразовании перед всасыванием.

3.2.4. Циклодекстрины

К циклодекстринам, которые прежде называли декстринами Шардингера или циклоамилозами, относят цикличные олигосахариды, образованные α-*D*-глюкопиранозильными звеньями со связью (1→4) (рис. 3.33). Эти цикличные структуры образуются из растворенных, частично гидролизованных полимеров крахмала (см. раздел 3.3.6.9) под воздействием фермента циклодекстрингликозилтрансферазы (ЦГТазы), которая катализирует внутримолекулярную циклизацию гликозильных цепей. Циклодекстрины могут состоять из 6, 7 или 8 гликозильных звеньев и называются соответственно α-, β- и γ-циклодекстринами. Промышленно циклодекстрины можно выделять выборочной кристаллизацией (после обработки реакционной смеси глюкоамилазой) или дифференцированным осаждением путем добавления комплексообразователя (обычно органического растворителя). Хотя все α- , β- и γ-циклодекстрины разрешены для использования в пищевых продуктах и имеют в США статус *GRAS* («признаны, как правило, безопасными для здоровья»), применяются в основном только β-циклодекстрины из-за их более низкой стоимости по сравнению с двумя другими типами и четко выраженного действия [48,56].

Циклодекстрины характеризуются геометрией усеченного конуса или тороидальным (бубликоподобным) видом с внутренним гидрофобным ядром или полостью и гидрофильной внешней поверхностью (рис. 3.34).

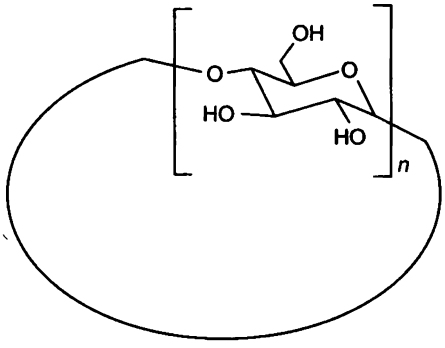


Рис. 3.33. Упрощенная структурная формула α- (*n* = 6), β- (*n* = 7) и γ- (*n* = 8) циклодекстринов

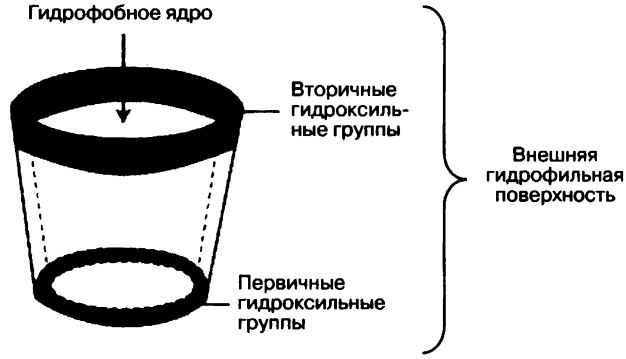


Рис. 3.34. Графическое представление примерной формы циклодекстринов

Растворимость циклодекстринов обусловлена наличием гидрофильных групп на внешней поверхности молекулы и у α-, β- и γ-циклодекстринов она различна (табл. 3.4). Наиболее растворим γ-циклодекстрин, за ним следует α-циклодекстрин, а наименее растворим в воде β-циклодекстрин (из-за протяженности внутримолекулярных водородных связей, охватывающих весь внешний периметр молекулы). Внутренняя полость обеспечивает гидрофобное окружение для образования комплексов с неполярными гидрофобными молекулами путем гидрофобных и других нековалентных ассоциаций. Размер этой внутренней полости с ростом числа циклодекстриновых звеньев увеличивается — у γ-циклодекстрина она больше, чем у β-циклодекстрина, а у последнего она больше чем у α-формы (табл. 3.4). Способность к комплексообразованию является одним из важнейших свойств циклодекстринов и позволяет использовать их в производстве почти всех пищевых продуктов и других отраслях промышленности. Что касается пищевой промышленности, то циклодекстрины применяют в разных целях:

- для образования комплексов с ароматизаторами, жирами, пищевыми красителями;
- для связывания нежелательных соединений (дающих посторонние привкусы и запахи, горечь);
- для удаления холестерина и свободных жирных кислот;
- для повышения стойкости к химическому окислению (например, для защиты вкусоароматических веществ, связывания фенольных соединений-предшественников ферментативного потемнения);

для усиления свойств нерастворимых в воде (липофильных) вкусоароматических веществ;

для улучшения физической стабильности ингредиентов пищевых продуктов (для инкапсулирования летучих веществ, контролируемого высвобождения вкусоароматических соединений).

Таблица 3.4
Характеристики α- , β- и γ-циклодекстринов

Характеристика	α-	β-	γ-
Число гликозильных звеньев	6	7	8
Молекулярная масса	972	1135	1297
Растворимость, г/100 см^3, при 25 °С	14,5	1,9	23,2
Диаметр полости, Å	4,7–5,3	6,0–6,5	7,5–8,3

3.3. Полисахариды

3.3.1. Химическая структура и свойства полисахаридов

Полисахариды — это полимеры моносахаридов [54, 65]. Как и олигосахариды, они состоят из линейно-связанных или разветвленных гликозильных звеньев. Большинство полисахаридов имеет более 10 или 20 моносахаридных остатков. Число моносахаридных звеньев полисахаридов (степень полимеризации, СП) может быть разным. Лишь у нескольких полисахаридов СП менее 100, и для большинства их она составляет от 200 до 300. Для крупных полисахаридов типа целлюлозы СП составляет 7000–15 000. Молекула амилопектина крахмала еще крупнее — его молекулярная масса не менее 10^7 (то есть СП более 60 000). Более 90% массы углеводов в природе приходится на долю полисахаридов. В науке полисахариды принято называть гликанами.

Если все гликозильные звенья принадлежат к одному виду сахара, то по мономерным звеньям они гомогенны и называются гомогликанами. Примерами линейных гомогликанов могут служить целлюлоза (см. раздел 3.3.7) и амилоза крахмала (см. раздел 3.3.6.1), а разветвленных — амилопектин (см. раздел 3.3.6.2). Все они состоят из *D*-глюкопиранозильных звеньев.

Если полисахарид состоит из двух и более звеньев различных моносахаридов, его называют гетерогликаном. Полисахарид, состоящий из двух различных звеньев моносахаридов — это дигетерогликан, из трех — тригетерогликан и т. д. Дигетерогликаны — это обычно либо линейные полимеры, состоящие из чередующихся блоков одинаковых звеньев, или линейные цепи гликозильных звеньев одного типа с ветвящимися от нее линейными цепями гликозильных звеньев другого типа. Примером полимеров первого

типа служат альгинаты (см. раздел 3.3.11), а второго — гуаровая камедь и камедь рожкового дерева (см. раздел 3.3.8).

В краткой нотации олиго- и полисахаридов гликозильные звенья обозначаются по первым трем буквам их названия (кроме глюкозы, обозначение которой — *Glc)*, причем первая буква прописная. Если моносахаридное звено представлено *D*-сахаром, то буква *D* опускается в отличие от *L*-сахаров (например, *L-Ara* — *L*-арабиноза). Размер кольца обозначают курсивным написанием — *p* для пиранозы или *f* для фуранозы. Аномерная конфигурация обозначается α или β — например, α-*D*-глюкопиранозильное звено обозначается α Glc*p*. Уроновые кислоты обозначают буквой А, например, *L*-гулопиранозилуроновая кислота обозначается LGul*p*A. Позиции связей обозначают либо стрелкой (1→3), либо запятой (1,3) — последний вариант, как правило, используется в биохимии, а первый — специалистами в области углеводов. В краткой нотации структура лактозы записывается как βGal*p*(1→4)Glc или βGal*p*1,4Glc, а мальтозы — βGlc*p*(1→4)Glc или βGlc*p*1,4Glc. Следует отметить, что редуцирующий конец нельзя обозначать α или β, или по форме пиранозного или фуранозного кольца (за исключением случаев кристаллического продукта), поскольку кольцо может размыкаться или замыкаться — в растворах лактозы, мальтозы и других олиго- и полисахаридов редуциующий конец будет присутствовать в виде смеси α- и β-пиранозных циклических форм и ациклической формы с быстрым преобразованием одной формы в другую (см. рис. 3.12).

3.3.2. Растворимость полисахаридов

Большинство полисахаридов содержат гликозильные звенья, имеющие в среднем три гидроксильные группы. Каждая из этих гидроксильных групп может образовывать водородные связи с одной и более молекулами воды. Образовывать водородные связи с водой может также атом кислорода кольца и гликозидный атом кислорода, соединяющий одно кольцо сахара с другим. Так как каждое звено сахара в цепи может удерживать молекулы воды, гликаны проявляют большое сродство к воде, и большинство из них в ее присутствии быстро гидратируется. В водных системах частицы полисахаридов могут захватывать воду, набухать и полностью или частично растворяться.

Подобно низкомолекулярным углеводам полисахариды изменяют и контролируют миграцию влаги в пищевых системах, а вода играет важную роль в физических и функциональных свойствах полисахаридов. Полисахариды и вода совместно регулируют многие функциональные и технологические свойства пищевых продуктов, включая их текстуру.

Воду, связанную водородными связями с молекулами полисахаридов, зачастую называют незамерзающей, то есть водой, структура которой значительно модифицирована присутствием полимерной молекулы так, что вода не замерзает. Такую воду также называют «пластифицирующей водой». Молекулы этой воды в химическом смысле энергетически не связаны, и поскольку они ограничены в своем перемещении, то могут быстро и свободно обмениваться с другими молекулами воды. Такая гидратационная вода составляет лишь часть общей влаги в гелях и свежих пищевых продуктах. При избытке гидратационной воды она захватывается капиллярами и полостями гелей или тканей.

Полисахариды считаются криостабилизаторами, а не криопротекторами. Они не слишком повышают осмоляльность и не снижают точку замерзания, так как у них крупные молекулы с высокой молекулярной массой, а сила осмоса и снижение точки замерзания — свойства коллигативные. При замораживании раствора полисахарида образуется двухфазная система кристаллической воды (лед) и стекловидного вещества, состоящего на 70% из молекул полисахаридов и 30% незамерзающей воды. Как и в случае растворов низкомолекулярных углеводов, незамерзающая вода является частью высококонцентрированного раствора, в котором подвижность молекул воды ограничена очень высокой вязкостью. Если одни полисахариды обеспечивают криостабилизацию путем образования концентрированного замораживанием матрикса, сильно ограничивающего подвижность молекул, то другие вызывают криостабилизацию путем ограничения роста кристаллов путем их абсорбции к центрам кристаллизации. По своей природе некоторые полисахариды сами являются центрами кристаллизации льда.

Таким образом, как высоко-, так и низкомолекулярные углеводы обычно эффективны для защиты пищевых продуктов при температурах замораживания (−18 °С) от деструктивных изменений текстуры и структуры, но в разной степени. Улучшение качества продуктов и их стабильности при хранении — это результат контроля как количества (особенно в случае низкомолекулярных углеводов), так и структурно-

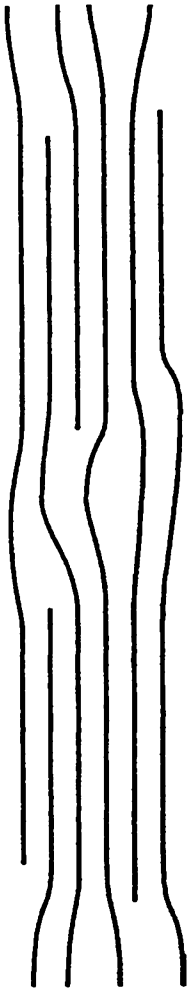


Рис. 3.35. Кристаллические области (в которых упорядоченные цепи параллельны), разделенные аморфными областями

го состояния (особенно в случае полисахародов) концентрированного замораживанием аморфного матрикса, окружающего кристаллы льда.

Большинство полисахаридов (кроме очень разветвленных) представляют собой разветвленные спиральные структуры. Некоторые линейные гомогликаны типа целлюлозы (см. раздел 3.3.7) имеют плоскую ленточную структуру. Такие типичные линейные цепи взаимодействуют друг с другом с помощью водородных связей, образуя кристаллические области, отделенные от аморфных областей (рис. 3.35). Именно эти кристаллические области линейных цепей дают высокопрочные целлюлозные нити типа древесных или хлопковых, не растворимые в воде и с высокой прочностью на разрыв (последнее обусловлено тем, что кристаллические области практически недоступны для действия ферментов). Вместе с тем, такие высокоориентированные и высококристалличные полисахариды — исключение. Большинство же полисахаридов не кристаллические, они быстро гидратируются и растворяются в воде.

Неразветвленные дигетерогликаны с нестандартными блоками гликозильных звеньев и наиболее разветвленные полисахариды не способны к образованию мицелл, поскольку сегменты их цепи защищены от уплотнения «упаковки» ленточной структурой, необходимой для межмолекулярного связывания, достаточного для формирования кристаллов определенного размера. Тем самым степень растворимости таких цепей возрастает по мере уменьшения плотности «упаковки». Как правило, растворимость полисахаридов повышается пропорционально возрастанию нерегулярности молекулярных цепей — иными словами, по мере уменьшения плотности межмолекулярной «упаковки».

Водорастворимые и модифицированные полисахариды, используемые в производстве пищевых продуктов и других отраслях промышленности, называют камедями или гидроколлоидами. Пищевые камеди поставляются в порошкообразной форме с различным размером частиц.

3.3.3. Вязкость и стабильность растворов полисахаридов

Полисахариды (камеди, гидроколлоиды) используются в пищевой промышленности прежде всего для загущения и/или желирования водных систем, для модификации и/или регулирования текучести и текстуры жидких продуктов, а также для изменения способности к деформации вязкопластичных (полутвердых) продуктов [12, 20]. Как правило, полисахариды вносят в пищевые продукты в количестве 0,25–0,50%, поскольку они обладают высокими гелеобразующими свойствами.

Вязкость раствора полимера зависит от размера и формы его молекул и конформаций, принимаемых ими в растворителе. Для пищевых продуктов и напитков функцию растворителя выполняет водный раствор характерных для данного продукта рствоpимых веществ. Формы молекул полисахаридов в растворе зависят от их ориентации относительно гликозидных связей. Чем больше внутренняя свобода каждой гликозидной связи, тем больше конформаций может быть у каждого отдельного сегмента. Гибкость цепи обусловливает значительный энтропийный вклад, который обычно превышает энергетический, и инициирует цепь к образованию в растворе клубка неупорядоченной конформации (рис. 3.36). Тем не менее конформации большинства полисахаридов характеризуются меньшей степенью неупорядоченности, образуя более жесткие клубки, причем их специфическая природа зависит от состава и связей моносахарида.

Движение линейных полимерных молекул в растворе приводит к образованию больших пустот. При столкновении молекул друг с другом создается трение, затрачивается энергия — именно так и возникает вязкость. Линейные полисахариды образуют высоковязкие растворы даже в низких концентрациях. Вязкость зависит как от степени полимерзации (молекулярной массы), так и от формы и гибкости растворенной полимерной цепи, причем наибольшую вязкость дают наиболее длинные, разветвленные и/или наиболее жесткие молекулы. Что касается степени полимеризации, то карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ, см. раздел 3.3.7.2) и продукты на ее основе в 2%-ной концентрации могут давать раствор с вязкостью от менее 5 до более 100 000 МПа·с.

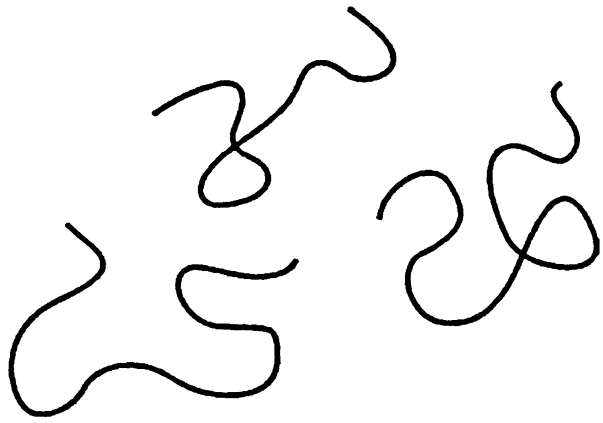


Рис. 3.36. Неупорядоченные клубки молекул полисахаридов

Высокоразветвленный полисахарид занимает гораздо меньший объем, чем линейный полисахарид той же молекулярной массы (рис. 3.37). В результате высокоразветвленные молекулы сталкиваются значительно реже и образуют гораздо менее вязкий раствор, чем линейные полимеры той же степени полимеризации. Таким образом, для образования раствора той же концентрации и вязкости молекула высокоразветвленного полисахарида должна быть значительно крупнее.

Аналогичным образом линейный полисахарид, несущий только один заряд иона (почти всегда отрицательный, обусловленный ионизированными карбоксильной или сульфатной группами), приводит к объемной конфигурации за счет отталкивания одноименных зарядов, что увеличивает линейную длину цепи и занимаемый полимером объем. Именно поэтому такие полимеры дают высоковязкие растворы.

Неразветвленные гликаны с регулярно повторяющимися звеньями образуют нестабильные водные дисперсии, которые быстро осаждаются или желируют. Это происходит вследствие сталкивания сегментов длинных молекул и образования межмолекулярных связей через несколько звеньев. Исходные короткие ровные участки приводят затем к образованию структур типа застежки «молния» и существенно усложененных межмолекулярных ассоциаций. Сегменты других цепей, сталкиваясь с таким организованным ядром,

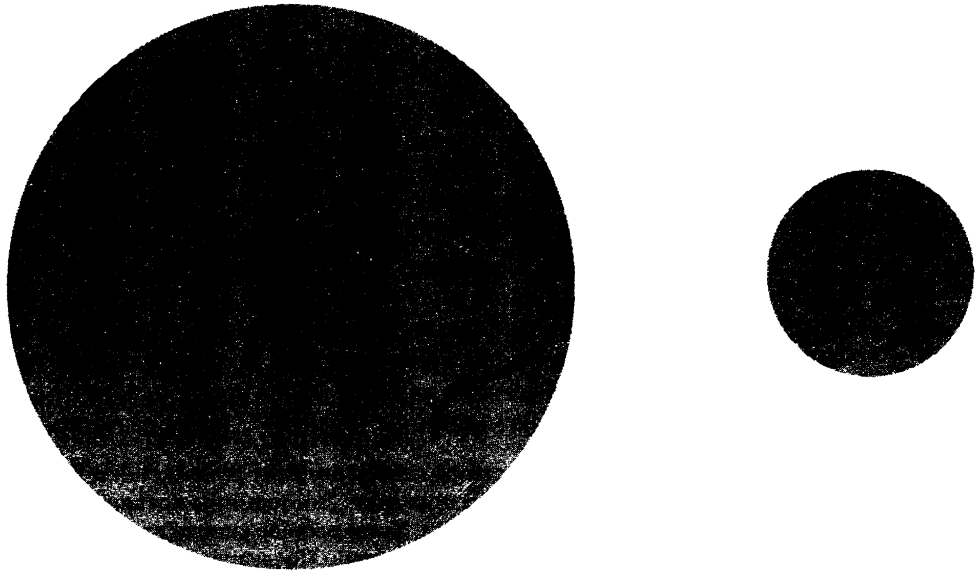


Рис. 3.37. Относительные объемы, занимаемые линейным и высокоразветвленным полисахаридами одинаковой молекулярной массы

связываются с ним, увеличивая долю упорядоченной кристаллической фазы. Линейные молекулы продолжают связываться с такой бахромчатой мицеллой, которая может достигнуть размера, при котором под действием силы тяжести начинается осаждение. Например, амилоза крахмала, растворенная при нагревании в воде и охлажденная затем до температуры ниже 65 °С, подвергается агрегации молекул и осаждается (этот процесс называется ретроградацией крахмала). При охлаждении хлебобулочных изделий молекулы амилозы ассоциируются, упрочняя структуру изделия. При длительном хранении боковые цепи амилопектина ассоциируются и могут частично кристаллизоваться, вызывая черствение (см. раздел 3.3.6.7).

Молекулы неразветвленных нейтральных гомогликанов по свой природе склонны к ассоциации и частичной кристаллизации. Тем не менее, при ветвлении или частичном ветвлении линейных гликанов, как, например, у гуаровой камеди (см. раздел 3.3.8) с однозвенными гликозильными ветвями вдоль основной цепи, их сегменты защищены от ассоциациирования, что приводит к образованию стабильных растворов.

Стабильные растворы образуются также, если в линейной цепи имеются заряженные группы, так что сближение сегментов предотвращается кулоновскими силами отталкивания. Как мы уже отмечали, силы отталкивания одноименных зарядов обусловливают расширение цепей и повышение вязкости. Подобные стабильные высоковязкие растворы образует, например, альгинат натрия (см. раздел 3.3.11), у которого все гликозильные звенья — это уроновая кислота с группой карбоновой кислоты в виде соли. Это относится и к ксантану, у которого уроновой кислотой представлена одна из пяти гликозильных групп и присутствует другая карбоксильная группа из циклического ацеталя пировиноградной кислоты (по одной на каждые 10 звеньев моносахарида). Если понизить значение pH раствора альгината до 3, когда подавляется ионизация карбоксильных групп, так как pK_a мономеров составляет соотвественно 3,38 и 3,65, то полученные слабоионизированные молекулы могут ассоциироваться и осаждаться, а также формировать гель подобно тому, как это происходит в случае неразветвленного незаряженного гликана.

Каррагинаны — это смеси линейных цепей разной структуры, имеющих отрицательный заряд из-за большого числа ионизированных сульфогрупп (см. раздел 3.3.10). Эти молекулы не осаждаются при низких значениях pH, так как сульфатная группа при всех значениях pH ионизирована.

Растворы камедей представляют собой дисперсии гидратированных молекул и/или их агрегатов. Реологические свойства таких растворов определяются размером, формой, способностью к деформации (гибкостью), а также наличием и величиной зарядов этих гидратированных молекул и/или агрегатов. Существует два типа поведения растворов полисахаридов — псевдопластический (наиболее распространенный) и тиксотропный, причем оба характеризуются постепенным разжижением при сдвиге.



Рис. 3.38. Логарифмическая функция вязкости псевдопластичной жидкости в зависимости от скорости сдвига. При увеличении сдвига вязкость уменьшается

При псевдопластическом поведении более быстрое течение обусловлено увеличением скорости сдвига: чем больше прилагаемая сила, тем меньше вязкость (рис. 3.38). Эта прилагаемая сила образуется при выливании, пережевывании, глотании, перекачке насосом — то есть под действием любых сил, способных вызывать сдвиг. Изменение вязкости не зависит от времени, то есть скорость течения мгновенно меняется при изменении скорости сдвига. Как правило, камеди с более высокой молекулярной массой образуют растворы с более псевдопластичным поведением, а линейные молекулы более «жесткой» структуры дают более псевдопластичное течение.

Растворы камедей менее псевдопластичны, то есть обусловливают «длинное течение»*; такие растворы воспринимаются

*«Короткое течение» псевдопластичного вязкого раствора характеризуется разжижением при сдвиге, а «длинное течение» — небольшим или вообще отсутствием такого разжижения. Эти термины появились задолго до появления приборов для определения и измерения реологических свойств. Когда раствор камеди или крахмала капали из пипетки или воронки, он выходил не длинной струей, а короткими каплями. Последнее обусловлено тем, что чем больше жидкости скапливается у отверстия, тем больше становится масса струи. Это заставляет жидкость течь все быстрее, и так происходит до тех пор, пока струя не разделяется на капли. — *Примеч. авт.*

как слизистые. Более псевдопластичные растворы, как мы уже отмечали, характеризуются коротким течением и обычно воспринимаются неслизистыми. Что касается науки о пищевых продуктах, то слизистые материалы воспринимаются густыми, обволакивающими ротовую полость; их трудно глотать. «Слизистость» обратно пропорциональна псевдопластичности, то есть неслизистые растворы должны быстро разжижаться при низких скоростях сдвига, характерных для пережевывания и глотания.

Второй тип разжижения при сдвиге — это тиксотропное течение. В этом случае уменьшение вязкости при увеличении скорости течения происходит не мгновенно. Вязкость тиксотропных растворов при постоянной скорости сдвига со временем уменьшается и после прекращения сдвига возвращается к значению начальной вязкости, но только через определенный промежуток времени. Такое поведение объясняется последовательными переходами от геля к раствору и обратно в гель. Другими словами, тиксотропный раствор — это слабый гель, который можно лить (см. раздел 3.3.4).

Для растворов большинства камедей с увеличением температуры вязкость уменьшается. Такое снижение вязкости при повышении температуры зачастую бывает очень важным, так как более твердые тела можно поместить в раствор при повышенной температуре, а затем загустить раствор путем охлаждения (исключением здесь является ксантановая камедь, так как вязкость ее растворов в интервале температур от 0 до 100 °С постоянна — см. раздел 3.3.9.).

3.3.4. Гели

Гель — это непрерывная трехмерная сеть соединенных молекул или частиц (кристаллов, капель эмульсии, агрегатов молекул или фибрилл) с большим объемом непрерывной жидкой фазы (наподобие намоченной губки) [12, 13, 26]. Во многих пищевых продуктах гелевая сеть состоит из полимерных (полисахаридных и/или белковых) молекул или фибрилл из полимерных молекул, соединенных водородными связями, гидрофобными ассоциациями (то есть Ван-дер-Ваальсовыми силами), ионными мостиками, сложными переплетениями молекул или ковалентными связями, а жидкая фаза — это водный раствор низкомолекулярных компонентов и частей полимерных цепей.

Для гелей свойственны свойства как твердых тел, так и жидкостей. При взаимодействии полимерных молекул или образованных ими фибрилл образуются зоны взаимодействия и трехмерная сеть (рис. 3.39), а жидкая фаза превращается в материал, способный частично или полностью удерживать свою форму. Структура трехмерной сети оказывает достаточное сопротивление приложенной нагрузке, что придает этой структуре вязкопластичные свойства. Вместе с тем непрерывная жидкая фаза, в которой молекулы остаются подвижными, делает гель менее твердым, чем обычное твердое тело, что обусловливает его некоторые свойства вязкой жидкости. Поэтому гель является вязкопластичным «полутвердым» телом или, другими словами, реакция геля на приложенную нагрузку характерна частично для эластичного твердого тела, а частично для вязкой жидкости.

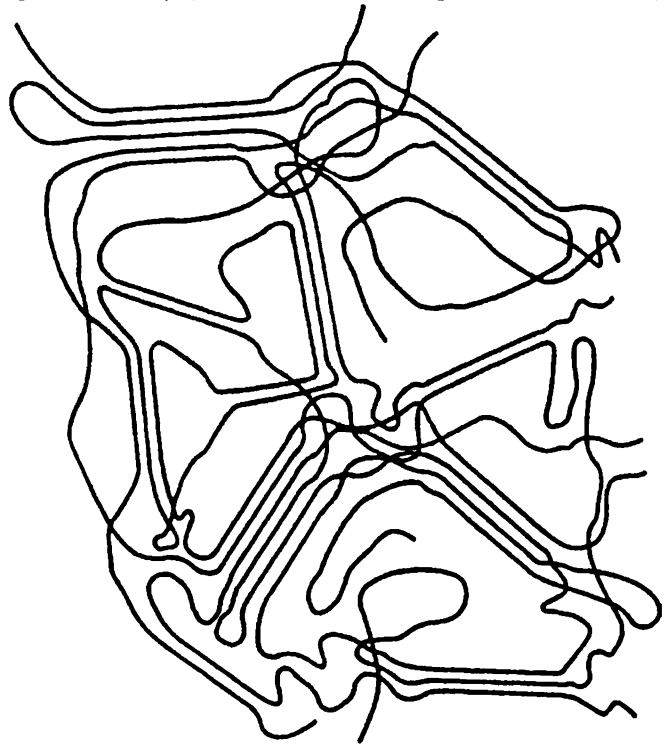


Рис. 3.39. Схематическое представление структуры трехмерной сетки гелей. Близко расположенные параллельные линии соответствуют упорядоченным кристаллическим структурам зон взаимодействия. В промежутках между этими зонами содержится водный раствор растворенных частей полимера и иных растворенных веществ

Несмотря на то что гелеобразные, похожие на мази и пасты материалы могут образовываться при высоких концентрациях частиц (наподобие томатной пасты), для формирования геля из

растворенных молекул камедей (гидроколлоидов) эти молекулы или их агрегаты должны частично выделиться из раствора в зонах взаимодействия и удерживаться в трехмерной сетевой гелевой структуре. Как правило, если после формирования геля зоны взаимодействия увеличиваются, сеть становится более компактной, структура сжимается и возникает синерезис, проявляющийся в появлении капель жидкости на поверхности геля.

Хотя в гелях полисахаридов обычно содержится не более 1% полимера, что соответствует 99% воды, они могут быть довольно прочными. Примерами таких гелей могут служить сладкие десерты, заливное, желированные кусочки фруктов, структурированные колечки репчатого лука, аналогичные мясу корма для животных, джемы, желе и жевательные конфеты.

Выбор конкретного гелеобразующего вещества (камеди) зависит от требуемых вязкости или прочности геля, реологических свойств, значения pH, температур переработки, взаимодействий с другими ингредиентами, текстуры и стоимости сырья. Необходимо учитывать и необходимые технологические характеристики — способность камеди быть связующим, наполнителем, ингибитором кристаллизации, осветлителем, замутнителем, пленкообразователем, эмульгатором, стабилизатором эмульсии, инкапсулирующим веществом, имитатором жира, хлопьеобразователем, стабилизатором пены, смазкой для форм, стабилизатором суспензии, веществом, способствующим набуханию или взбиванию, ингибитором синерезиса. Учитывается также ее способность к поглощению и удержанию влаги (влагоудерживающая способность, ВУС, и регулирование миграции влаги). Каждая пищевая камедь характеризуется своими особыми, уникальными свойствами, которые зачастую и определяют ее выбор для промышленного применения (табл. 3.5).

3.3.5. Гидролиз полисахаридов

Полисахариды менее стойки к гидролитическому расщеплению, чем белки, и иногда в ходе кулинарной обработки и/или хранения пищевых продуктов могут подвергаться деполимеризации*.

Пищевые камеди зачастую медленно деполимеризуются. Одна причина такого поведения состоит в том, что для получения требуемого «тела» («ощущения во рту») без нежелательного увеличения вязкости их вносят в высокой концентрации.

Гидролиз гликозидных связей между моносахаридными (гликозильными) звеньями олиго- и полисахаридов может катализироваться кислотами (H^+) и/или ферментами. Степень деполимеризации, приводящая к снижению вязкости, определяется по кислому значению pH, температуре, продолжительности пребывания при этих температуре и значении pH, а также по структуре конкретного полисахарида. Чаще всего гидролиз проходит при термообработке кислых продуктов (в противоположность хранению) из-за высоких температур. Дефектов, возникающих при деполимеризации в ходе термообработки, как правило, пытаются избежать путем введения в рецептуру большего количества полисахарида (камеди), использованием более вязкого сорта камеди (для компенсации деполимеризации) или камеди, более стойкой в кислой среде. Деполимеризация может быть важным индикатором срока годности продукта.

Полисахариды также подвержены ферментно-катализируемому гидролизу. Скорость и конечные продукты такого гидролиза зависят от подбора специфического фермента, значения pH, температуры и времени. Как и все углеводы, полисахариды расщепляются микроорганизмами из-за их подверженности ферментно-катализируемому гидролизу. Кроме того, камеди очень редко поставляются в стерильном виде, что следует учитывать при их применении как ингредиентов пищевых продуктов.

3.3.6. Крахмал

Уникальные физико-химические и нутритивные свойства крахмала выделяют его из всех других углеводов [66, 68]. Крахмал — это доминирующее питательное вещество растений, он обеспечивает поступление в организм человека 70–80% калорий. Крахмал и продукты его гидролиза составляют большую часть усваиваемых углеводов в рационе. В количественном отношении крахмал, используемый для переработки пищевых продуктов (без учета его содержания в хлебопекарной муке и его нативного содержания в зерне,

* Вместе с тем полисахариды не подвержены денатурации. — *Примеч. авт.*

используемом для производства зерновых завтраков, а также во фруктах и овощах) значительно превышает общее использование всех других пищевых гидроколлоидов.

Промышленно выпускаемые типы крахмала получают из зерен злаков, в том числе из обыкновенной кукурузы, восковой кукурузы (воскового маиса), высокоамилозной кукурузы, пшеницы, различных сортов риса, а также из корнеплодов, в частности из картофеля и маниоки (тапиоки). Крахмалы, в том числе модифицированные, широко применяются на пищевых производствах благодая их клейкости, связующим и замутняющим свойствам; они используются для посыпки, пленко- и пенообразования, клейстеризации, глазирования, удержания влаги, стабилизации, текстуризации, а также как наполнитель.

Крахмал уникален тем, что в природе он встречается в виде дискретных гранул. Гранулы крахмала нерастворимы и в холодной воде гидратируются лишь частично. В результате они диспергируются в воде с получением маловязкого теста, которое легко перемешивать и перекачивать даже при концентрациях крахмала выше 35%. Загущающие свойства крахмала проявляются лишь при нагревании взвеси гранул. Нагревание 5%-ной взвеси большинства немодифицированных крахмалов до температуры около 80 °С при перемешивании дает высоковязкую дисперсию (тесто). Еще одна уникальная особенность крахмала состоит в том, что большинство гранул крахмала состоят из смеси двух полимеров — почти линейного полисахарида амилозы и высокоразветвленного полисахарида амилопектина.

3.3.6.1. Амилоза

Несмотря на то что амилоза — это почти линейная цепь (1→4)-связанных α-*D*-глюкопиранозильных звеньев, во многих молекулах амилозы присутствуют несколько цепей, присоединенных посредством α-*D*-(1→6) связи. Такие ответвления характерны примерно для одного из 180–320 звеньев (или 0,3–0,5%). Ответвления в разветвленных молекулах амилозы могут быть как очень длинными, так и очень короткими, причем большинство точек ответвления разделены большими расстояниями. Благодаря этому физические свойства амилозы в целом примерно такие же, как у линейных молекул. Молекулярная масса амилозы составляет в среднем 10^6.

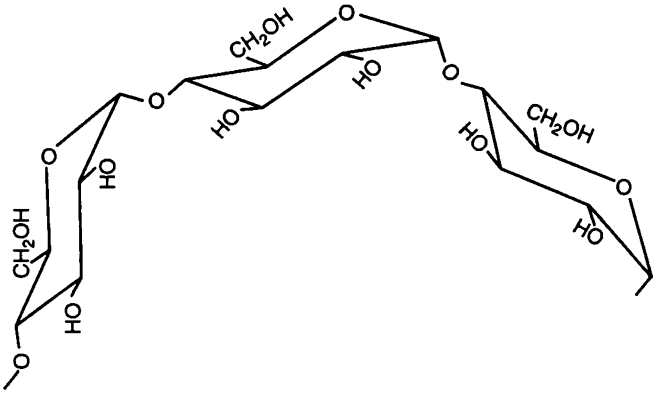


Рис. 3.40. Трисахаридный сегмент неразветвленного участка молекулы амилозы или амилопектина

Аксиально-экваториальная конфигурация (1→4)-связанных α-*D*-глюкопиранозильных звеньев в цепях амилозы придает молекулам форму правой спирали или форму геликса (рис. 3.40). Во внутренней части такой спирали содержатся преимущественно атомы водорода, так что она гидрофобна и липофильна, а гидроксильные группы расположены на ее внешней части. При виде на геликс по оси сверху он очень напоминает «стопку» молекул α-циклодекстрина (см. раздел 3.2.4), так как в каждом витке спирали содержится около 6 (1→4)-связанных α-*D*-глюкопиранозильных звеньев.

В большинстве крахмалов около 25% амилозы (табл. 3.6). В двух видах промышленно выпускаемого высокоамилозного кукурузного крахмала содержится соответственно 52 и 70–75% амилозы.

3.3.6.2. Амилопектин

Молекула амилопектина — это очень крупная сильноразветвленная молекула, у которой разветвления составляют 4–5% общего числа связей. В цепи амилопектина только одна редуцирующая концевая группа, к которой присоединено множество боковых цепей, а к ним, в свою очередь, присоединены еще одна или несколько боковых цепей («третий слой»). Ответвления молекул амилопектина сгруппированы в кластеры (рис. 3.41) и имеют вид двойных спиралей (геликсов) [39]. Молекулярная масса (от 10^7, СП около 60 000, до $5 \cdot 10^8$, СП около 3 000 000) делает молекулы амилопектина одними из самых крупных молекул в природе, если не самыми крупными.

Таблица 3.5

Основные водорастворимые некрахмалистые полисахариды, применяемые в пищевой промышленности

Камеди	Источник происхождения	Классификация	Форма макромолекулы	Мономерные звенья и связи (примерное соотношение)	Неуглеводная замещающая группа
Альгины (альгинаты), в основном альгинат натрия	Бурые водоросли	Экстрат морских водорослей, Поли(уроновая кислота)	Линейная	Блочный сополимер из: →4)-βManpA(1,0) →4)-αLGulpA (0,5–2,5)	Гидроксипропил-эфирные группы в пропиленгликоль-альгинате (ПГА)
Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ)	Целлюлоза	Модифицированная целлюлоза	Линейная	→4)-βGlcp-(l→	Карбоксиметиловый эфир (СЗ 0,4–0,8)[a]
Каррагинаны	Красные водоросли	Экстракты морских водорослей Сульфированные галактаны	Линейная	к типы: →3)-βGalp4-SO–3 (1→4)-3,6An-αGalp (1→ ι типы: →3)-βGalp 4-SO3– (l→4)-3,6An-αGalp 2-SO3–(l→ λ типы: →3)-βGalp 2-SO–3 (l→4)-αGalp 2,6-diSO–3(l→	Сульфатированный полуэфир

[a] Понятия СЗ и МЗ изложены в разделах 3.3.6.10 и 3.4.3.

Растворимость в воде	Важнейшие свойства	Основные виды применения в пищевых продуктах
Растворимый альгинат натрия	Гели с Ca^{2+} Вязкие, не слишком псевдопластичные растворы	Образует нетающие гели (десертные, аналоги фруктов, другие структурированные продукты) Аналоги мяса
Нерастворимая альгиновая кислота		Альгиновая кислота дает мягкие тиксотропные гели (томатная заливка, желейная начинка, начинки для зерновых завтраков с фруктами)
Растворимые	Поверхностно активны, растворы устойчивы по отношению к кислотам и Ca^{2+}	Стабилизация эмульсии в кремообразных салатных дрессингах Загуститель для низкокалорийных салатных дрессингов
Высокая	Прозрачные стабильные растворы как псевдопластичные, так и тиксотропные	Задерживает рост кристаллов льда в мороженом и других замороженных десертах Загуститель, суспендирующее вещество, защитный коллоид; улучшает «ощущение во рту», «тело» и текстуру различных салатных дресиснгов, соусов и спредов Смазка, пленкообразователь, технологическая добавка в экструдированные продукты Загуститель жидкого теста и увлажнитель для кексов и аналогичных продуктов Влагоудерживающее вещество, замедляющее кристаллизацию и/или синерезис в посыпках, глазурях, топпингах, начинках и пудингах Загуститель для сиропов Суспендирующее вещество и загуститель напитков из сухих концентратов, употребляемых в горячем и холодном виде Основа подливы для сухих кормов для животных
к типы: соль Na^+ растворима в холодной воде, соли K^+ и Ca^{2+} нерастворимы; все соли растворимы при температурах выше 65 °С; растворимы в горячем молоке, в холодном молоке нерастворимы	Образуют прочные хрупкие термообратимые гели при $K^+ > Ca^{2+}$; сгущают и желируют молоко в низких концентрациях; проявляют синергизм при желировании с камедью бобов рожкового дерева	Вторичный стабилизатор в мороженом и родственных ему продуктах Производство сгущенного молока, смесей для детского питания, стабильных при замораживании-размораживании взбитых сливок, молочных десертов и шоколадного молока Кляр для мясных продуктов Улучшение адгезии и ВУС в эмульгированных мясных продуктах Улучшение текстуры и качества мясных продуктов с пониженным содержанием жира
ι типы: соль Na^+ растворима в холодной воде, а соли K^+ и Ca^{2+} нерастворимы, все соли растворимы при температурах выше 55 °С; растворимы в горячем молоке, но в холодном молоке нерастворимы	При $Ca^{2+} > K^+$ образуют мягкие, эластичные, термообратимые гели; гели не проявляют синерезис и стабильны в циклах замораживания-размораживания	
Все соли растворимы в горячих и холодных воде и молоке	Загущает холодное молоко	

Таблица 3.5.
(продолжение)

Камеди	Источник происхождения	Классификация	Форма макромолекулы	Мономерные звенья и связи (примерное соотношение)	Неуглеводная замещающая группа
Курдлан	Ферментационная среда	Полисахарид, продуцируемый микроорганизмами	Линейная	→)3-βGlcp-(1→	
Геллан	Ферментационная среда	Полисахарид, продуцируемый микроорганизмами	Линейная	→4)-αLRhap-(1→3)-βGlcp-(1→4)-βGlcpA-(1→4)-βGlcp-(1→	В нативном геллане в каждом повторяющемся звене присутствует группа ацетатного и глицератного эфира
Гуаровая камедь	Зерна гуара	Зерна галактоманнана	Линейная с однозвенными ответвлениями (со свойствами линейного полимера)	→4)-βManp(~0,56) αGalp ↓ 6 →4)-βManp(~1,0) (Man:Gal = ~ 1,56:1)	
Гуммиарабик (камедь акации)	Дерево акации	Смолистый экссудат	Высокоразветвленная структура	Сложная, изменяющаяся структура с полипептидами	
Инулин	Корень цикория	Растительный экстракт	Линейная	→2)-βFruf(1→	
Камедь рожкового дерева (КРД),	Плоды рожкового дерева (цератония)	Зерна галактоманнана	Линейная с однозвенными ответвлениями (проявляет свойства линейного полимера)	→4)-βManp(~2,5) αGalp 1 ↓ 6 →4)-βManp(~1,0) (Man:Gal = ~ 3,5:1)	

Растворимость в воде	Важнейшие свойства	Основные виды применения в пищевых продуктах
Растворим	При нагревании раствора гели необратимы	Слоистые нетающие гели для десертов
Растворим в теплой воде	Гели с любым катионом Растворы характеризуются высоким пределом упругости Низкоацилированные типы образуют прочные хрупкие неэластичные гели Высокоацильные типы образуют мягкие эластичные нехрупкие гели	Хлебопекарные смеси Питательные батоничики Функциональные безалкогольные напитки Фруктовые топпинги Сметана и йогурты
Высокая	Стабильные прозрачные очень вязкие среднепсевдопластичные растворы Экономичное загущение	Связывает воду, предотвращает рост кристаллов льда, улучшает «ощущение во рту», смягчает текстуру, обусловленную каррагинаном и камедью бобов рожкового дерева, замедляет таяние мороженого и аналогичных продуктов Молочные продукты, готовые блюда, хлебобулочные изделия, соусы, корма для животных
Очень высокая	Эмульгатор и стабилизатор эмульсии Совместим с высокими концентрациями сахара Очень низкая вязкость в высоких концентрациях	Предотвращает кристаллизацию сахара в кондитерских изделиях Эмульгирует и распределяет жировые компоненты в кондитерских изделиях Препараты ароматизаторов в виде эмульсии «масло-в-воде» Компонент глазури дражированных конфет Препараты порошкообразных ароматизаторов
Растворим	Образует гели при охлаждении горячих растворов Может использоваться как имитатор жира	Ингредиент питательных зерновых «энергетических» батончиков и овощных лепешек (патти) как источник пищевых волокон и имитатор жира
Растворима только в горячей воде, температура для полной солюбилизации — не ниже 90 °С	При взаимодействии с ксантаном и каррагинаном образуется прочный гель; редко применяется по отдельности	Очень высокая стойкость к тепловому шоку, равномерное таяние, придает желаемую текстуру мороженому и другим замороженным десертам

Таблица 3.5
(окончание)

Камеди	Источник происхождения	Классификация	Форма макромолекулы	Мономерные звенья и связи (примерное соотношение)	Неуглеводная замещающая группа
Метил-(МЦ) и гидроксипропилметилцеллюлозы (МЦ и ГПМЦ)	Целлюлоза	Модифицированная целлюлоза	Линейная	→4)-βGlcp-(1→	Гидроксипропиловые (МЗ 0,02–0,3)[a] и метиловые (СЗ 1,1–2,2)[a] эфирные группы
Пектины	Кожура цитрусовых, Яблочные выжимки	Растительный-экстракт Поли(уроновая кислота)	Линейная	В основном состоят из звеньев →4)-βGalpA	Метиленовые эфирные группы Могут присутствовать амидные группы
Ксантановая камедь	Ферментационная среда	Полисахарид, продуцируемый микроорганизмами	Линейная с трисахаридными звеньями; разветвляется на каждом втором звене основной цепи (проявляет свойства линейного полимера)	βManp 1 ↓ 4 βGlcp A 1 ↓ 2 αManp 6-Ac 1 ↓ 3 →4)-βGlcp-(1→4)-βGlcp-(1→	Ацетиловый эфир Циклический ацеталь пировиноградной кислоты на концевых группах βManp

Растворимость в воде	Важнейшие свойства	Основные виды применения в пищевых продуктах
Растворим в холодной воде; в горячей воде нерастворим	Прозрачные растворы, желируемые при нагревании, проявляют поверхностно-активные свойства	МЦ: Проявляет жироподобные свойства Снижает абсорбцию жира в жаренных продуктах Придает «сливочность» за счет увеличения вязкости и образования пленки Обеспечивает смазывающие свойства Удерживает газ при выпечке Удерживает влагу и регулирует ее распределение в хлебобулочных изделиях (увеличивает срок годности, сохраняя мягкость) ГПМЦ: В немолочных взбитых топпингах стабилизирует пену, улучшает взбиваемость, предотвращает разделение фаз и обеспечивает стабильность в циклах замораживания-размораживания
Растворим	Образует желе- и джемоподобные гели в присутствии сахара и кислоты, а также ионов Ca^{2+}	Высокометоксилированный пектин: желе с высоким содержанием сахара, джемы, пресервы, мармелады Кисломолочные продукты Низкометоксилированный пектин: Диетические желе, джемы, пресервы и мармелады
Высокая	Очень псевдопластичные и очень вязкие растворы; превосходный стабилизатор эмульсий и суспензий, не изменяет вязкость раствора при изменении температуры и значения pH; прекрасно совместим с солью; дает синергическое увеличение вязкости при взаимодействии с гуаровой камедью; при взамодействии с КБРД термообратимы	Стабилизация дисперсий, суспензий и эмульсий Загуститель

Таблица 3.6

Основные характеристики некоторых гранул крахмала и получаемого из них клейстера

Характеристика	Обычный кукурузный крахмал	Крахмал из восковой кукурузы	Высокоамилозный кукурузный крахмал	Картофельный крахмал	Крахмал из тапиоки	Пшеничный крахмал
Размер гранул (по главной оси), мкм	2–30	2–30	2–24	5–100	4–35	2–55
Массовая доля амилозы, %	28	< 2	50–70	21	17	28
Темература клейстеризации, °C[a]	62–80	63–72	66–170[b]	58–65	52–65	52–85
Относительная вязкость	Средняя	От средней до высокой	Очень низкая[b]	Очень высокая	Высокая	Низкая
Реологические свойства клейстера[c]	Короткое течение	Длинное течение	Короткое течение	Очень длинное течение	Длинное течение	Короткое течение
Прозрачность клейстера	Непрозрачный	Слгка мутный	Непрозрачный	Прозрачный	Прозрачный	Непрозрачный
Способность к клейстеризации/ретроградации	Высокая	Очень низкая	Очень высокая	От средней до низкой	Средняя	Высокая
Жир, % от степени замещения	0,8	0,2		0,1	0,1	0,9
Белок, % от степени замещения	0,35	0,25	0,5	0,1	0,1	0,4
Фосфор, % от степени замещения	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
Вкус и аромат	Легкий зерновой	«Чистый»		Легкий	Слабый	Легкий зерновой

[a] От начальной температуры клейстеризации до полного образования клейстера.

[b] При обычных условиях тепловой обработки (95–100 °C) вязкость высокоамилозного кукурузного крахмала практически отсутствует. Клейстер образуется только после достижения температуры 160– 170 °C.

[c] Пояснения длинного и короткого течения даны в разделе 3.3.3.

Амилопектин присутствует во всех видах крахмала, причем его содержание в наиболее распространенных крахмалах составляет около 75% (см. табл. 3.6). Некоторые крахмалы полностью состоят из амилопектина — их называют восковыми или амилопектиновыми крахмалами. Восковая кукуруза (восковой маис), первый злак, у которого было признано, что крахмал из него состоит только из амилопектина, названа так потому, что разрез зерна имеет стеклоподобный, воскообразный вид. Большинство других амилопектиновых крахмалов также называют восковыми, хотя воск в них, как и в кукурузе, отсутствует.

Картофельный амилопектин уникален среди промышленных крахмалов тем, что в нем больше фосфатных эфирных групп. Чаще всего (на 60–70%) они присоединены в позиции О-6, а каждая третья — в позиции О-3. Эти фосфатные эфирные группы встречаются по одной на каждые 215–560 α-*D*-глюкопиранозильных звеньев.

3.3.6.3. Гранулы крахмала

Гранулы крахмала состоят из радиально расположенных молекул амилозы и/или амилопектина. В них присутствуют как кристаллические, так и некристаллические области, чередующимися слоями*. Сгруппированные ответвления амилопектина имеют вид упакованных двойных спиралей, а «упаковка» этих биспиральных структур образует маленькие кристаллические ламели (пластинки). В более плотных слоях гранул крахмала, чередующихся с менее плотными аморфными слоями, больше таких кристаллических

* Гранулы крахмала состоят из слоев, чем-то напоминающих структуру луковицы, только эти слои нельзя отделить. — *Примеч. авт.*

ламелей. Радиально-упорядоченное расположение молекул крахмала в грануле очевидно из двойного лучепреломления гранул, свидетельством чего является поляризационный крест (белый крест на черном фоне), видимый в поляризационном микроскопе с поляризаторами, установленными под углом 90° Центр креста приходится на хилум, откуда растет гранула.

Гранулы кукурузного крахмала даже из одного источника имеют разную форму — некоторые почти сферические, некоторые заостренные, а некоторые зубчатые (размер гранул приведен в табл. 3.6). Гранулы пшеничного крахмала двояковыпуклые и характеризуются бимодальным распределением размеров (примерно от менее 10 и более 10 мкм), причем самые крупные гранулы имеют выраженную двояковыпуклую форму. Гранулы рисового крахмала — самые мелкие из промышленно выпускаемых крахмалов (1–9 мкм), хотя примерно тот же размер имеют и самые мелкие гранулы пшеничного крахмала. Большинство гранул картофельного и других крахмалов из корнеплодов обычно больше гранул зернового крахмала (гранулы картофельного крахмала могут достигать 100 мкм по главной оси) — такой крахмал менее плотный и его легче варить.

Во всех промышленно выпускаемых крахмалах содержатся небольшое количества золы, жира и белка (см. табл. 3.6). Содержание фосфора в картофельном крахмале (0,06–0,1%, 600–1000 мг/кг) обусловлено присутствием фосфатных эфирных групп в молекулах амилопектина, которые придают амилопектину картофельного крахмала слабый отрицательный заряд. Этот заряд вызван кулоновскими силами отталкивания, участвующими в быстром набухании гранул картофельного крахмала в теплой воде и в ряде свойств картофельного клейстера, а именно в его высокой вязкости, прозрачности (см. табл. 3.6) и низкой скорости ретроградации (см. раздел 3.3.6.7). В молекулах крахмала злаков или вообще нет фосфатных эфирных групп, или их количество гораздо меньше, чем в молекулах картофельного крахмала. Эндогенные липиды характерны только для крахмалов злаков — к ним относятся прежде всего свободные жирные кислоты (СЖК) и лизофосфолипиды (ЛФЛ), представленные главным образом лизофосфатидилхолином (в кукурузном крахмале — 89%). Содержание СЖК и ЛФЛ в различных зерновых крахмалах варьирует [72].

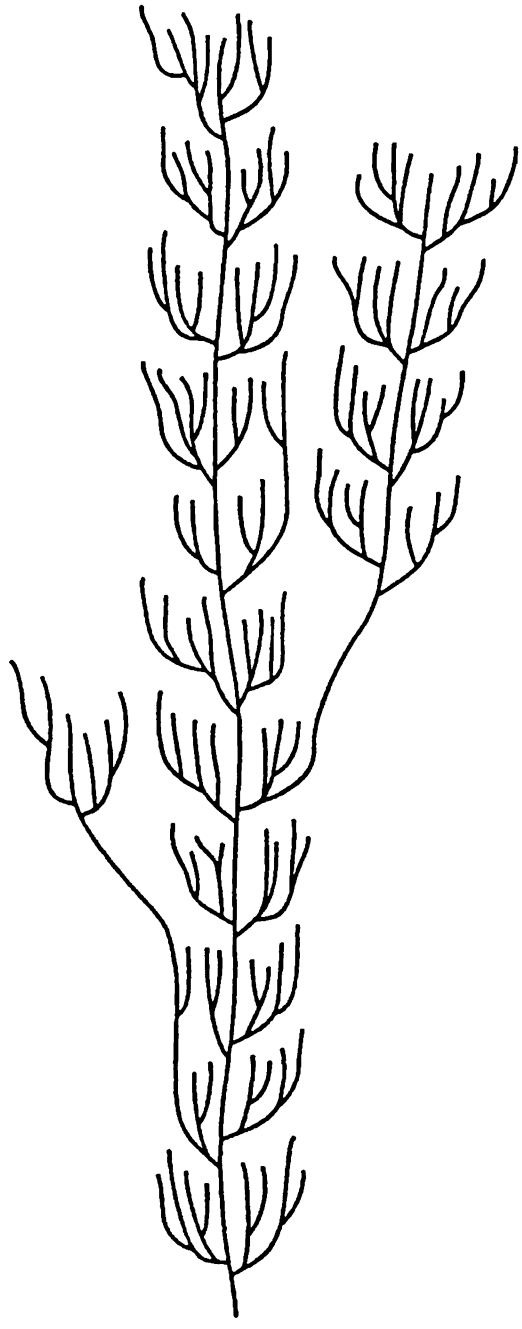


Рис. 3.41. Графическое представление одного участка молекулы амилопектина

3.3.6.4. Клейстеризация крахмала

Неповрежденные гранулы крахмала в холодной воде нерастворимы, но могут обратимо поглощать воду, слегка набухая, а при высыхании возвращаясь к исходному размеру. При нагревании в воде гранулы крахмала подвергаются процессу, называемому клейстеризацией (желатинизацией). Клейстеризация — это нарушение упорядоченности молекулярного строения гранул [6, 52]. Признаки нарушения упорядоченности включают необратимое набухание гранул, утрату двойного лучепреломления и потерю кристалличности.

При клейстеризации происходит вымывание амилозы, которое может начаться еще до клейстеризации. Полная клейстеризация гранул крахмала одного вида происходит в определенном интервале температур (см. табл. 3.6). Температура начальной клейстеризации и условия, в которых она происходит, зависят от способа измерений и соотношения «крахмал/вода», типа гранул и гетерогенности группы исследуемых гранул (все исследуемые группы гранул крахмала гетерогенны). Выделяют несколько температур клейстеризации группы гранул — температуру начала, температуру средней точки и температуру окончания клейстеризации.

Продолжительное нагревание гранул крахмала в большом количестве воды приводит к вымыванию растворимых компонентов (в первую очередь, амилозы) и полному разрыву гранул под действием сил трения. Все это приводит к образованию крахмального клейстера (клейстером называют то, что получается при нагревании крахмальной суспензии). В результате набухания и разрыва гранул получается вязкая масса (клейстер), состоящая из непрерывной фазы растворенной амилозы и/или амилопектина и дисперсной фазы остатков гранул крахмала (фрагментов или призраков*). Полного диспергирования можно добиться только в условиях высоких температур, трения и избытка воды, то есть в условиях, редко встречающихся в производстве пищевых продуктов. После охлаждения горячего клейстера из кукурузного крахмала получается вязкоупругий прочный гель.

Так как клейстеризация крахмала — процесс эндотермический, то для ее контроля широко применяются методы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), позволяющие измерять как температуру, так и энтальпию клейстеризации. Хотя данные ДСК и процессы, происходящие при клейстеризации, можно интерпретировать по-разному, общепринято следующее понимание. Вода играет роль пластификатора. Эффект от усиления мобильности молекул сначала возникает в аморфных областях, которые с физической точки зрения стеклоподобны. При варке гранул крахмала в достаточном количестве воды (не менее 60%) и при конкретной температуре (T_g, температуре стеклования), в пластифицированных аморфных областях гранул происходит фазовый переход из стеклообразного в резинообразное состояние**. При использовании ДСК пик поглощения энергии, связанный с фазовым переходом, наблюдается очень редко, так как области кристалличности, то есть упорядоченные упакованные двойные спирали амилопектина, соприкасаются и соединяются ковалентными связями с аморфными областями, и плавление кристаллических областей следует сразу же после перехода в стеклообразное состояние. Поскольку энтальпия начального плавления (T_m) намного превышает энтальпию стеклования, последнее обычно бывает не заметно.

Плавление комплексов «липид-амилоза» происходит при гораздо более высоких температурах (100–120 °C) при избытке воды, чем плавление двойных спиралей амилопектина, упакованных по типу кристаллов. Липидно-амилозные комплексы образуются из одиночных спиральных сегментов молекул амилозы, при охлаждении клейстера, содержащего жирные кислоты или липиды моноацилглицеринов. У восковых крахмалов (без амилозы) пик ДСК при этом не наблюдается.

В нормальных условиях переработки пищевых продуктов (температуры и содержания влаги) гранулы крахмала быстро набухают и переходят точку обратимости. Молекулы воды проникают между цепями крахмала, разрывают межмолекулярные связи и образуют вокруг отдельных молекул гидратирующие слои. Тем самым молекулы крахмала пластифицируются («смазываются»), лучше отделяются друг от друга и сольватируются. Наличие больших количеств воды приводит к набуханию гранул, которые становятся в несколько раз больше. При аккуратном перемешивании и нагреве 5%-ной суспензии крахмала его гранулы поглощают воду до тех пор, пока не будет абсорбирована большая часть воды; молекулы разбухают, прижимаются друг к другу, и в емкости образуется вязкий крахмальный клейстер, большая часть воды в котором находится внутри разбухших гранул. Вязкость такого клейстера сравнима с вязкостью пудинга, поскольку его большая часть образована разбухшими гранулами, с трудом перемещающимися относительно друг друга. При перемешивании такие разбухшие гранулы нативного крахмала легко разрываются и дезинтегрируются, приводя к дальнейшему увеличению вязкости. После набухания гранул крахмала

---

* Призраком гранул называют остаток после варки без перемешивания или при умеренном перемешивании, состоящий из внешней части гранулы. Выглядит он как нерастворимая внешняя оболочка гранул. — *Примеч. авт.*

** Стекло — это твердое тело в таком состоянии аморфного вещества, которое получается при затвердевании переохлажденной жидкости. Резиноподобное состояние характерно для недоохлажденной вязкопластичной жидкости (см. главу 2). — *Примеч. авт.*

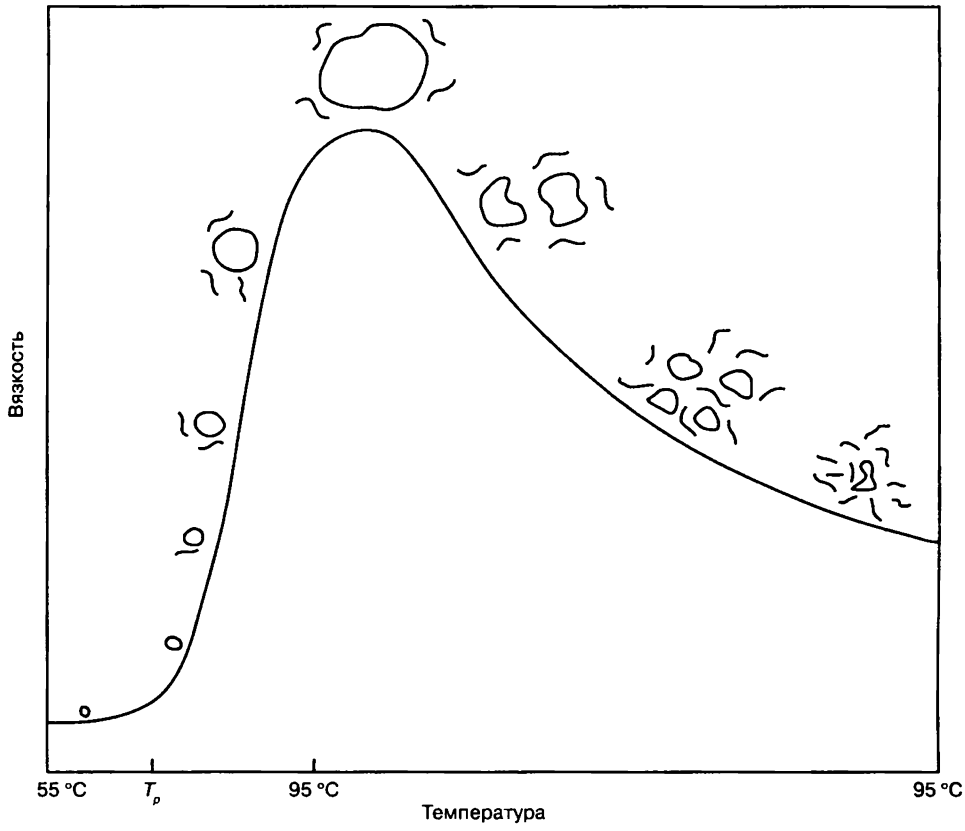


Рис. 3.42. Наглядная кривая клейстеризации, свидетельствующая об изменении вязкости при нагревании суспензии гранул крахмала до 95 °C с последующим выдерживанием при этой температуре (использовался измерительный прибор с низкой скоростью сдвига)

гидратированные молекулы амилозы диффундируют через массу во внешнюю фазу (воду), что во многом объясняет некоторые аспекты поведения теста. Результаты набухания крахмала можно измерить различными инструментами, регистрирующими изменение вязкости сначала при повышении температуры, а затем при постоянной температуре и при ее снижении (рис. 3.42).

Большинство крахмальных суспензий при нагревании помешивают для предотвращения оседания грунул на дно. Перемешивание используется и в измерительных приборах, регистрирующих изменения при клейстеризации в виде функции от температуры в виде кривых, приведенных на рис. 3.42. К моменту достижения максимальной вязкости некоторые гранулы разрушаются. При продолжении перемешивания разрушается и фрагментируется все больше гранул, что приводит к последующему снижению вязкости. При охлаждении некоторые молекулы крахмала частично реассоциируются с образованием осадка или геля. Этот процесс называют ретроградацией крахмала (см. раздел 3.3.6.7). Прочность такого геля зависит от количества зон взаимодействия (см. раздел 3.3.4), на образование которых влияет присутствие других ингредиентов — жиров, белков, сахаров, кислот — и количество воды.

3.3.6.5. Применение немодифицированных крахмалов

В производстве пищевых продуктов крахмалы выполняют разные функции. В основном их используют для получения требуемых текстурных свойств (см. раздел 3.3.6.9), поскольку они обеспечивают объем и массу изделий. Степень клейстеризации крахмала в хлебобулочных и мучных кондитерских изделиях сильно влияет на свойства готового продукта, в том числе на стабильность при хранении и скорость усвоения в организме. В изделиях из теста с низким содержанием влаги многие гранулы крахмала остаются не клейстеризованными, тогда как в изделиях с высоким содержанием влаги большинство или все гранулы клейстеризованы.

Большинство крахмалов, используемых в качестве ингредиента, относятся к «модифицированным пищевым крахмалам» (см. раздел 3.3.6.10), поскольку текстура натурального крахмального клейстера, особенно из кукурузного крахмала, нежелательна. Более желательны прозрачные клейстеры из крахмала восковой кукурузы, но даже этот крахмал для улучшения его технологических свойств обычно химически модифицируют. Немодифицированный картофельный крахмал применяют в производстве экструдированных зерновых завтраков и снеков, а также сухих суповых и кондитерских смесей. Рисовый крахмал дает непрозрачный клейстер, используемый в производстве детского питания. Клейстеры из воскового риса прозрачные и клейкие, тогда как клейстеры из пшеничного крахмала довольно слабые и обладают слабым вкусом и ароматом из-за остаточного содержания компонентов муки. Картофельный крахмал и крахмал из тапиоки характеризуются слабыми межмолекулярными связями и сильно набухают. Из них получаются высоковязкие клейстеры (см. табл. 3.6), но под действием сдвига их вязкость быстро снижается из-за быстрого разрушения набухших гранул.

3.3.6.6. Клейстеризация крахмала в растительных тканях

Большая часть пищевого крахмала присутствует в продуктах из зернового или овощного сырья, в которых крахмал составляет основную часть сухих веществ. Именно поэтому важно понимать термические свойства крахмала в этой нативной среде, поскольку они связаны с приемлемой текстурой переработанных пищевых продуктов. Степень клейстеризации крахмала в пищевых системах обычно зависит как от содержания влаги, так и от степени термического воздействия. Как мы уже отмечали, в некоторых хлебобулочных и мучных кондитерских изделиях гранулы крахмала могут остаться неклейстеризованными даже после нагревания до высоких температур. В корочке пирогов и некоторых видах печенья с высоким содержанием жира и небольшим влаги около 90% гранул пшеничного крахмала остаются неклейстеризованными. В хлебном мякише и кексах с высоким содержанием влаги (около 96%) гранулы пшеничного крахмала клейстеризованы, но поскольку они нагревались без воздействия сдвига, присутствие этих гранул видно невооруженным глазом и их можно изолировать, пусть и в деформированном виде [1, 29, 30, 45].

Тепловой обработки овощей (бланширования, запекания, варки в воде или на пару, жарки) обычно бывает достаточно для требуемого размягчения растительных тканей. После такой тепловой обработки растительные волокна легче отделяются друг от друга вдоль паренхиматозных клеток.

Паренхиматозная ткань — наиболее распространенный тип тканей съедобных растений. Как правило, она состоит из агрегированных клеток многоугольной формы, в каждой из которых присутствуют кластеры гранул крахмала, окруженные целлюлозной клеточной стенкой. Соседние клетки соединяются и прикрепляются друг к другу с помощью срединной ламели, состоящей главным образом из пектиновых веществ. Вода, основной компонент большинства растительных тканей, накапливается преимущественно в вакуолях клеток (84%), а также в гранулах крахмала (13%) и компонентах клеточной стенки (3%).

При нагревании растительных тканей полукристаллизованные гранулы крахмала забирают воду из клеток, набухают и клейстеризуются (рис. 3.43). Нативной влаги в паренхиматозной ткани обычно бывает достаточно для пластификации гранул крахмала и его клейстеризации. Вместе с тем температура, при которой это происходит, для гранул крахмала внутри нативных растительных клеток несколько выше, чем для уже изолированного крахмала. Более высокую температуру клейстеризации крахмала *in situ* относят на счет присутствия растворенных веществ. Несмотря на то что клейстеризация крахмала в растительной ткани считается полной (то есть упорядоченность молекул полностью утрачивается), набухание гранул ограничено окружающими клеточными стенками. Гранулы крахмала при набухании (с некоторым вымыванием амилозы из клеточных стенок) заполняют большую часть объема соответствующих клеток, превращаясь в набухшую крахмальную массу со слаборазличимыми остатками гранул. Набухание гранул при нагревании оказывает определенное внутреннее давление (примерно 100 кПа) на клеточные стенки паренхиматозных клеток. Хотя величина этого давления набухания сама по себе недостаточна для расщепления клеток, которые в основном остаются неповрежденными, изолированные паренхиматозные клетки картофеля несколько увеличиваются в размере и приобретают в результате клейстеризации крахмала более сферическую форму. Такое «округление» клеток происходит из-за разложения пектина в срединной ламели путем β-элиминирования, что вызывает размягчение паренхиматозной ткани. Поскольку это характерное явление размягчения наблюдается в тканях, не содержащих больших количеств крахмала

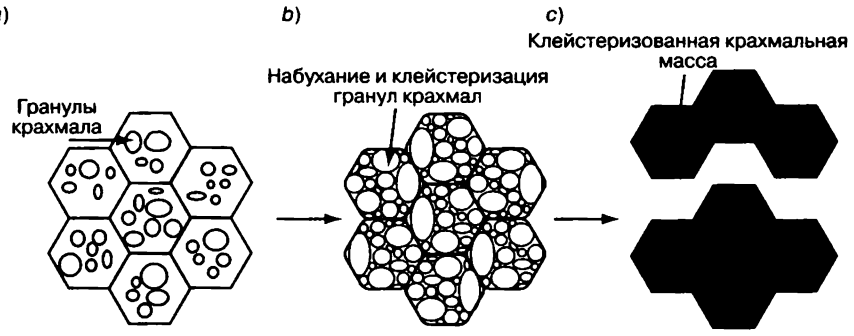


Рис. 3.43. В паренхиматозной растительной ткани гранулы крахмала (*a*) при нагревании набухают и крейстеризуются при нагревании, оказывая определенное давление на окружающие клеточные стенки (*b*); в ходе дальнейшего нагревания в клетках образуется почти однородная клейстеризованная крахмальная масса (*c*). Нагретая растительная ткань становится склонной к расслоению (разделению клеток), что в основном обусловлено расщеплением пектина в срединной ламели и некоторым давлением набухающего крахмал

(например, в тканях томатов), то его приписывают в основноми расщеплению пектина в срединной ламели.

Тем не менее, в крахмалосодержащих тканях, в частности, картофеля, высокое содержание крахмала и/или степень набухания гранул крахмала зачастую обусловливает получение более мягких разваренных тканей. Считается, что вышеупомянутое явление «округления» клеток приводит к давлению на частично расщепленную, ослабленную среднюю ламель с последующим разделением клеток или тканей. Кроме того, степень набухания клейстеризованных гранул крахмала и заполнения объема паренхиматозных клеток влияет на ощущение влажности ткани во рту. Высокие содержание крахмала и способность к набуханию обычно больше способствуют связыванию свободной влаги в подвергаемой обработке ткани, что вызывает ощущение «сухости». Текстуру отварного картофеля традиционно описывают в терминах «рассыпчатости» и «клейкости». Рассыпчатость текстуры обусловливается легкокрошащейся сухой на вид тканью, а «клейкая» воскоподобная ткань, которую не следует путать с восковым крахмалом, характеризуется большей влажностью, резиноподобным ощущеним во рту и более жесткой текстурой. Как правило, «клейкий» картофель легче перерабатывать в картофель «фри», пюре и т. д., но его также используют для варки и консервирования. В заключение отметим, что поведение крахмала при клейстеризации оказывает существенное влияние на текстуру приготавливаемых продуктов из растительного сырья и свойства готовых продуктов, а также благодаря «округлению» клеток влияет на размягчение и влагосвязывающую способность паренхиматозной ткани.

3.3.6.7. Ретроградация крахмала и черствение

Как мы уже отмечали, охлаждение горячего крахмального клейстера, как правило, приводит к образованию прочного вязкопластичного геля. Образование в геле зон взаимодействия может считаться первой стадией кристаллизации молекул крахмала. В ходе охлаждения и хранения крахмального клейстера крахмал постепенно становится менее растворимым, а в разбавленном растворе молекулы крахмала начинают осаждаться. Совокупность процессов уменьшения растворимости молекул крахмала в растворе или клейстере называется ретроградацией крахмала. Ретроградация крахмала затрагивает оба образующие его полимера (амилозу и амилопектин), причем ретроградация амилозы происходит гораздо быстрее, чем амилопектина. Скорость ретроградации зависит от нескольких факторов, в том числе от молекулярного соотношения амилозы и амилопектина, а также от структуры их молекул, что определяется типом растительного источника крахмала, температурой, массовой долей крахмала, а также наличием и содержанием других ингредиентов, прежде всего ПАВ и солей. Многие дефекты качества пищевых продуктов, а именно черствение хлебобулочных изделий, снижение вязкости и образование осадка у супов и соусов обусловлены, по крайней мере частично, именно ретроградацией крахмала [23, 42, 43, 52].

Черствение хлебобулочных изделий проявляется в увеличении твердости корочки и потерей ощущения «свежести» продукта. Черствение начинается сразу же после завершения выпечки и начала охлаждения.

Скорость черствения зависит от рецептуры, технологии хлебопечения и условий хранения. Черствение частично обусловлено постепенным переходом аморфного крахмала в частично кристаллическое состояние ретроградации. В изделиях с содержанием влаги, достаточным для клейстеризации гранул крахмала без потери ими своей идентичности, ретроградация амилозы (потеря растворимости) в основном завершается ко времени достижения продуктом комнатной температуры. Считается, что для ретроградации амилопектина, включающей первичное ассоциирование его внешних ответвлений, требуется гораздо больше времени, чем для ретроградации амилозы. Это делает ретроградации амилопектина доминирующим фактором в процессе черствения после охлаждения продукта.

Большинство полярных липидов с поверхностно-активными свойствами замедляют отверждение комков благодаря образованию комплексов с полимерными молекулами крахмала. В состав хлебопекарного теста и других выпекаемых изделий поэтому включают такие добавки, как глицерина монопальмитат (ГМП), другие моноглицериды и их производные, а также натрия стеароил-2-лактилат, способствующие увеличению срока годности готовых изделий.

3.3.6.8. Комплексы крахмала

Поскольку молекулы амилозы имеют вид спирали (геликса) с гидрофобной (липофильной) внутренней частью, они способны образовывать комплексы с линейными гидрофобными частями других молекул, способными поместиться в гидрофобной трубке. Так, комплексы с молекулами и амилозы, и амилопектина образует йод (в форме I_3^-). В этом случае коплексообразование происходит во внутренней гидрофобной части спиральных сегментов. Что касается амилозы, то длинные спиральные сегменты позволяют образоваться длинным полимерным цепям I_3^- и обусловливают появление синего окрашивания, используемого для обнаружения крахмала. В комплексе амилозы с йодом содержится 19% йода. Определение количества комплексообразователя может быть использовано для измерения количества присутствующей в крахмале амилозы. Амилопектин дает с йодом красно-фиолетовое окрашивание, поскольку разветвления цепочек амилопектина слишком короткие, чтобы обеспечить формирование длинных полимерных цепей (I_3^-) [7].

В результате комплексообразования полярные липиды (поверхностно-активные вещества, эмульгаторы и жирные кислоты) оказывают влияние на тесто и другие крахмалосодержащие продукты одним из трех возможных способов:

путем воздействия на процессы клейстеризации (потери двойного лучепреломления, разбухания гранул крахмала, вымывания амилозы, плавления кристаллических областей гранул крахмала, увеличения вязкости в процессе приготовления);

путем изменения реологических свойств образующегося теста;

путем ингибирования кристаллизации молекул крахмала при процессах его ретроградации.

В этом случае комплексообразование эмульгаторов с амилозным компонентом протекает намного быстрее и оказывает на нее значительно большее влияние, чем на амилопектиновый компонент. Именно поэтому эмульгаторы значительно сильнее влияют на обычный крахмал, чем на крахмал из восковой кукурузы.

Комплексы с крахмалом образуют и некоторые вкусоароматические вещества, что затрудняет вкусовое восприятие крахмалосодержащих продуктов. Связывание вкусоароматических веществ с молекулами крахмала (в основном с амилозой) дает комплексные эффекты — конкурентные, синергические и антагонистические. Основной же причиной, по которой все полисахариды (крахмалы и камеди) снижают вкусовые ощущения от вкусоароматических веществ, является ограничение диффузии молекул вкусоароматических соединений к вкусовым сосочкам языка и поверхностям, с которой они могли бы улетучиться. Это обусловлено тем, что крахмал и камеди увеличивают вязкость продукта. Какие процессы и специфические изменения произойдут в конкретной пищевой системе, зависит от структуры полярного липида, а также конкретных видов крахмала и продуктов, в которые его вносят.

3.3.6.9. Гидролиз крахмала

Молекулы крахмала, как и другие молекулы полисахаридов, деполимеризуются под воздействием горячих кислот. Гидролиз гликозидных связей протекает более или менее случайно, приводя к образованию на

начальной стадии очень крупных фрагментов. В промышленности хорошо перемешанный порошкообразный крахмал опрыскивают соляной кислотой или перемешанный слабоувлажненный гранулированный крахмал обрабатывают газообразным HCl, после чего смесь нагревают до достижения требуемой степени деполимеризации [51, 61].

Кислоту затем нейтрализуют, а готовый продукт восстанавливают, промывают и сушат. Собственно продукт при этом еще имеет гранулированную форму, но он расщепляется на более мелкие части (вываривается) намного легче, чем исходный необработанный крахмал. Такой продукт называют кислотно-модифицированным крахмалом, крахмалом жидкой садки или разжиженным крахмалом. Даже при гидролизе очень небольшого числа гликозидных связей гранулы крахмала при варке в воде дезинтегрируются намного легче. Кислотно-модифицированные крахмалы образуют более прозрачные и прочные гели даже несмотря на меньшую вязкость раствора. Такие крахмалы используют в качестве пленкообразователей и адгезивов в производстве таких продуктов, как дражированные орешки и конфеты, а также для получения прочных гелей (например, для жевательных конфет, апельсиновых долек и мятных пластинок) и покрытий головок сыра. Для получения продукта, образующего особо прочный и быстро затвердевающий гель, в качестве основы используют крахмал из высокоамилозного зерна. Основные свойства продуктов гидролиза крахмала приведены в табл. 3.7.

Таблица 3.7
Основные свойства продуктов гидролиза крахмала

Свойства, усиливаемые при увеличении степени гидролиза[a]	Свойства, усиливаемые в продуктах с меньшей степенью гидролиза[b]
Степень сладости	Увеличение вязкости
Гигроскопичность и ВУС	Способность к формированию «тела» продукта
Снижение температуры замерзания	Стабилизация пены
Усиление вкуса и аромата	Ингибирование роста кристаллов
Способность к ферментации	Ингибирование кристаллизации сахара
Реакция потемнения	

[a] Сиропы с высокой степенью осахаривания (сиропы с высоким декстрозным эквивалентом, ДЭ).
[b] Сиропы с низкой степенью осахаривания (с низким ДЭ) и мальтодекстрины.

При расширении кислотной деполимеризации гранул крахмала образуются декстрины, способные при той же концентрации, что и кислотно-модифицированные крахмалы, образовывать менее вязкие продукты. Поэтому при переработке пищевых продуктов декстрины можно использовать в более высоких концентрациях. Декстрины обладают пленкообразующими и адгезивными свойствами и применяются в производстве дражированных орешков и конфет. Их также используют в качестве наполнителей, инкапсулирующих веществ и носителей вкусоароматических соединений, особенно при распылительной сушке. Классифицируют декстрины по их растворимости в холодной воде и цвету. Декстрины с большим числом линейных цепей или их длинных фрагментов образуют прочные гели.

Неполный гидролиз крахмальных дисперсий (теста), как кислотный, так и ферментативный, дает смеси мальтоолигосахаридов (крахмальных олигосахаридов), которые специалисты называют мальтодекстринами. Мальтодекстрины обычно классифицируют по их декстрозному эквиваленту (ДЭ). Со степенью полимеризации (СП) ДЭ связан следующим соотношением:

$$ДЭ = 100/СП,$$

где и ДЭ и СП — средние значения для совокупности молекул. Следовательно, ДЭ некоторого продукта гидролиза — это его редуцирующая способность, выраженная в процентах от редуцирующей способности чистой *D*-глюкозы (декстрозы), и таким образом ДЭ обратно пропорционален средней молекулярной массе. Мальтодекстрины — это продукты с измеряемыми значениями ДЭ, не превышающими 20 (среднее значение ДЭ мальтодекстринов > 5). Мальтодекстрины с наименьшим ДЭ, то есть с наибольшей средней молекулярной массой, негигроскопичны, а мальтодекстрины с наибольшими значениями ДЭ впитывают влагу. Мальтодекстрины безвкусны, у них практически отсутствует сладость и они очень удобны для ис-

пользования в пищевых системах. Гидролиз до значений ДЭ 20–60 дает смеси молекул, которые после сушки называются СВ кукурузного сиропа. Они быстрорастворимы и обладают средней степенью сладости.

Продолжение гидролиза крахмала приводит к образованию смеси *D*-глюкозы, мальтозы и других мальтоолигосахаридов. Соответствующие сиропы с различным соотношением компонентов производятся в огромных количествах. Один из наиболее распространенных сиропов имеет ДЭ 42. Такие сиропы очень стабильны, поскольку кристаллизация в таких сложных смесях затруднена. Поставляются они в виде сиропов с высокой осмоляльностью (с содержанием СВ около 70%), достаточно высокой для ингибирования роста обычных микроорганизмов. Примером может служить вафельный и блинный сироп карамельного цвета со вкусом и ароматом кленового сиропа.

Для промышленного гидролиза крахмала до *D*-глюкозы используют три-четыре фермента. α-Амилаза – это эндогенный фермент, который расщепляет молекулы и амилозы, и амилопектина до олигосахаридов. Более крупные молекулы олигосахаридов, получившиеся в результате гидролиза, могут однократно, дважды или трижды разветвляться по (1→6) связям, поскольку α-амилаза действует только по (1→4)-связям крахмала. α-Амилаза не действует на сегменты с двойной спиральной структурой полимерной цепи крахмала или полимерные сегменты, участвующие в комплексообразовании с полярными липидами (стабилизированные сегменты с одинарной спиралью).

Глюкоамилаза (амилоглюкозидаза) промышленно используется в сочетании с α-амилазой для получения *D*-глюкозного (декстрозного) сиропа и кристаллической *D*-глюкозы. Этот фермент действует на полностью клейстеризованный крахмал как экзогенный фермент, последовательно высвобождающий единичные *D*-глюкозные фрагменты с нередуцирующих концов молекул амилозы и амилопектина, даже если те соединены (1→6)-связями. Тем самым этот фермент может полностью гидролизовать крахмал до *D*-глюкозы, но его используют всегда для крахмала, который к этому моменту для образования большего числа фрагментов уже был частично деполимеризован α-амилазой, то есть у него больше нередуцирующих концов.

Фермент β-амилаза последовательно высвобождает с нередуцирующих концов полимерных цепей крахмала дисахарид мальтозу. Когда субстратом является амилопектин, фермент действует на нередуцирующие концы, последовательно высвобождая мальтозу, но он не может расщеплять (1→6)-связи в точках ветвления. Тем самым остаются усеченные остатки амилопектина, называемые предельными декстринами, точнее β-предельными.

Существуют несколько ферментов, специфически катализирующих гидролиз (1→6)-связей в амилопектине с образованием многочисленных линейных молекул с небольшой молекулярной массой, одним из которых является изоамилаза, а вторым — пуллуланаза.

Циклодекстрин-глюканотрансфераза представляет собой уникальный фермент, продуцируемый микроорганизмами рода *Bacillus* и образующий кольца из (1→4)-связанных α-*D*-глюкопиранозильных фрагментов полимеров крахмала. Такие структуры называют циклодекстринами (см. раздел 3.2.4). Основным источником *D*-глюкозы и *D*-фруктозы является глюкозный сироп, в США зачастую называемый кукурузным. Чтобы приготовить сироп, водную суспензию крахмала смешивают с термостабильной α-амилазой и пропускают через особый варочный аппарат, где происходит быстрая клейстеризация и ферментативно катализируемый гидролиз. После охлаждения до 55–60 °С гидролиз продолжают при помощи глюкоамилазы; затем сироп осветляют, концентрируют, удаляют примеси с помощью активированного угля и деионизируют. После достижения необходимой степени осветления и внесения затравочных кристаллов получается кристаллическая *D*-глюкоза.

Для производства *D*-фруктозы раствор *D*-глюкозы пропускают через колонку с иммобилизованной изомеразой глюкозы. Этот фермент катализирует реакцию изомеризации *D*-глюкозы до *D* -фруктозы (см. рис. 3.5) и образуется равновесную смесь примерно с 58% *D*-глюкозы и 42% *D*-фруктозы. Обычно требуются более высокие концентрации *D*-фруктозы (в высокофруктозном сиропе, часто используемом для подслащивания безалкогольных напитков, *D*-фруктозы примерно 55%). Чтобы приготовить сироп с содержанием *D*-глюкозы более 42%, изомеризованный сироп пропускают через емкость с катионообменной смолой в форме кальциевой соли. Эта смола связывает *D*-фруктозу, которую затем регенерируют и для получения продукта с повышенным содержанием *D*-фруктозы добавляют к обычному сиропу.

3.3.6.10. Модифицированные пищевые крахмалы

Переработчики пищевых продуктов обычно предпочитают использовать крахмал с улучшенными характеристиками. Натуральные крахмалы дают при варке слабые, клейкие, резиноподобные клейстеры, из которых после охлаждения получаются гели с нежелательными свойствами. В целях улучшения характеристик теста и гелей проводят модификацию крахмала. В результате некоторые клейстеры выдерживают воздействие нагревания, сдвига и кислот в конкретных условиях переработки, а некоторые иные способы модификации позволяют обеспечить требуемые технологические свойства. Модифицированные пищевые крахмалы представляют собой макроингредиенты и добавки, обладающие нужными технологическими свойствами [5, 66, 68].

Способы модификации могут быть химическими или физическими. В результате химической модификации получаются сшитые, стабилизированные, окисленные и деполимеризованные продукты (кислотномодифицированные разжиженные, см. раздел 3.3.6.9). Способы физической модификации позволяют получить предварительно клейстеризованные продукты (см. раздел 3.3.6.11), набухающие в холодной воде (см. раздел 3.3.6.12). Наибольшее влияние на технологические свойства крахмала оказывает химическая модификация, и большую часть модифицированных крахмалов получают путем использования реагентов, образующих с гидроксильной группой простые и сложные эфиры. Модификация может быть и одностадийной, однако модифицированные крахмалы зачастую получают в одну, две, три, а иногда и четыре стадии.

В настоящее время для получения модифицированного крахмала в США разрешены и используются следующие типы химических реакций:

- этерификация уксусным или янтарным ангидридом, смешанным ангидридом из уксусной и адипиновой кислот, 1-октенилянтарным ангидридом, фосфорилхлоридом, триметафосфатом или ортофосфатом мононатрия;

  этерификация пропиленоксидом;

  кислотная модификация соляной и серной кислотами;

  отбеливание пероксидом водорода, надуксусной кислотой, перманганатом калия и гипохлоритом натрия;

  окисление гипохлоритом натрия,

а также различные комбинации этих реакций.

К разрешенным к применению и промышленно используемым модифицированным крахмалам относятся:

Стабилизированные крахмалы

Гидроксипропиловые крахмалы;

Ацетаты крахмала;

Октенилсукцинаты крахмала;

Фосфат монокрахмала (сложный эфир).

Сшитые крахмалы

Фосфат дикрахмала;

Адипат дикрахмала;

Сшитые и стабилизированные крахмалы

Гидроксипропиловый фосфат дикрахмала;

Фосфорилированный фосфат дикрахмала;

Ацетилированный фосфат дикрахмала;

Ацетилированный адипат дикрахмала.

У сшитых крахмалов выше температура клейстеризации, сопротивление сдвигу и стойкость к низким значениям pH. Они образуют более вязкое и стойкое тесто, чем исходный крахмал.

У стабилизированных крахмалов ниже температура клейстеризации, они легче редиспергируются в ходе предварительной клейстеризации и дают тесто и гели с меньшей склонностью к ретроградации, то есть более стабильные в циклах замораживания-оттаивания и более прозрачные, чем исходный крахмал.

Окисленные гипохлоритом модифицированные крахмалы обладают большей степенью белизны, у них ниже температура клейстеризации, более низкая максимальная вязкость теста; из них получаются более мягкие прозрачные гели, чем из немодифицированного крахмала.

Сшитые и стабилизированные крахмалы обычно характеризуются пониженной температурой клейстеризации, более вязким тестом и другими характерными для сшивки и стабилизации свойствами.

У разжиженных, то есть слабо деполимеризованных продуктов ниже температура клейстеризации и меньше вязкость, чем у исходного крахмала.

Модифицировать можно крахмал из любого источника (кукурузный, из восковой кукурузы, картофельный, из тапиоки, пшеничный, рисовый и т. д.), но практически модифицируют в промышленных масштабах только крахмал из обычной или восковой кукурузы и картофельный (в меньшей степени — пшеничный и крахмал из тапиоки). В пищевой промышленности США особенно популярен модифицированный крахмал из восковой кукурузы. Пасты из обычного немодифицированного кукурузного крахмала образуют гели, которые, как правило, очень клейкие, резиноподобные и склонны к синерезису (то есть отделению влаги). Пасты из крахмала, полученного из восковой кукурузы, менее склонны образовывать гели при комнатной температуре, в связи с чем их чаще применяют в виде пищевого крахмала, однако при хранении при температурах охлаждения или замораживания клейстер из этого крахмала становится мутноватым, трескается и проявляет синерезис. Для повышения стабильности теста крахмал из восковой кукурузы модифицируют. Наиболее распространенным производным для этих целей является его гидроксипропиловый эфир (см. далее).

Характерными технологическими свойствами, обеспечиваемыми применением особых комбинаций модифицированных крахмалов, являются: снижение энергопотребления (улучшение клейстеризации и тестообразования), изменение поведения при варке, повышение растворимости, уменьшение или увеличение вязкости теста, повышение стабильности в циклах замораживания-оттаивания, улучшение прозрачности, блеска, уменьшение или увеличение гелеобразования и прочности геля, уменьшение синерезиса, улучшение взаимодействия с другими компонентами, улучшение стабилизирующих и пленкообразующих свойств, водостойкости пленки, снижение липкости клейстера, а также повышение стойкости к кислотам, нагреванию и сдвигу.

Как и у всех углеводов, различные гидроксильные группы крахмала вступают в разные реакции. У модифицированных крахмалов модифицированы лишь немногие гидроксильные группы. Как правило, эфирные группы (простые и сложные) связаны малой степенью замещения* Степень замещения зачастую меньше 0,1 и варьирует от 0,002 до 0,2 в зависимости от способа модификации. Так, в среднем на каждые 500 *D*-глюкопиранозильных звеньев приходится одна замещенная группа. Такие небольшие степени преобразования существенно изменяют свойства крахмалов и расширяют области их применения.

Простые и сложные эфиры крахмалов, получаемые этерификацией монофункциональными реагентами, препятствуют межмолекулярным ассоциациям, что снижает способность крахмального клейстера к гелеобразованию и ведет к осаждению. Такую модификацию зачастую называют стабилизацией, а получаемый продукт — стабилизированным крахмалом (см. далее). Использование бифункциональных компонентов дает сшитые крахмалы. Модифицированные пищевые крахмалы зачастую являются как сшитыми, так и стабилизированными.

Ацетилирование крахмала (в пищевых продуктах допускается использование СЗ до 0,09) приводит к понижению температуры клейстеризации, улучшению прозрачности, стойкости к ретроградации и стабильности в циклах замораживания-оттаивания (но не такому эффективному, как при гидроксипропилировании). Моноэфиры фосфата крахмала (рис. 3.44) получают обработкой крахмала триполифосфатом натрия или мононатрия ортофосфатом. Используются такие моноэфиры для увеличения прочности клейстера, его прозрачности и стабильности в циклах замораживания-оттаивания. У этих моноэфиров тянущаяся, клейкая текстура. Вязкость клейстера обычно велика и зависит от концентрации реагента, продолжи-

* Степень замещения (СЗ) определяется как среднее число этерифицированных гидроксильных групп, приходящихся на одно звено моносахарида. Как у разветвленных, так и у не разветвленных полисахаридов, состоящих из гексопиранозильных звеньев, в среднем на один мономер приходятся три гидроксильные группы. Следовательно, максимально возможная СЗ для крахмала и целлюлозы равна 3,0, однако максимально возможная СЗ не разрешена к использованию в пищевых продуктах. — *Примеч. авт.*

тельности реакции, температуры и значения pH. Фосфатная этерификация понижает температуру клейстеризации. В США разрешена степень замещения фосфатных групп не более 0,002.

При приготовлении эфира алкенилсукцината крахмала к молекулам полимера присоединяется гидрофобная цепочка углевода (рис. 3.45). Даже при очень малой степени замещения молекулы 1-октенилсукцината крахмала из-за гидрофобности алкенильных групп сосредоточены на границе раздела фаз эмульсии «масло-в-воде». Такое свойство позволяет применять их для стабилизации эмульсий. Продукты на основе такого крахмала находят широкое применение в случаях, когда необходима стабильность эмульсии, например, в производстве ароматизированных безалкогольных напитков. Наличие алифатической цепи придает производным крахмала органолептическое ощущение «жирности», благодря чему их можно использовать в некоторых продуктах в качестве заменителя жира. Продукты с более высокой степенью замещения являются несмачиваемыми и используются в качестве разрыхлителей — технологической добавки, которой посыпают пласты теста.

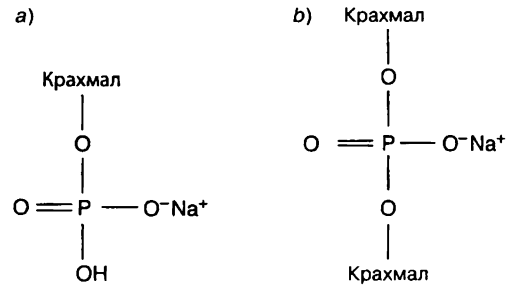


Рис. 3.44. Структура моноэфира фосфата (*a*) и диэфира (*b*). В диэфире объединены две молекулы, благодаря чему обеспечивается сшивка гранул крахмала

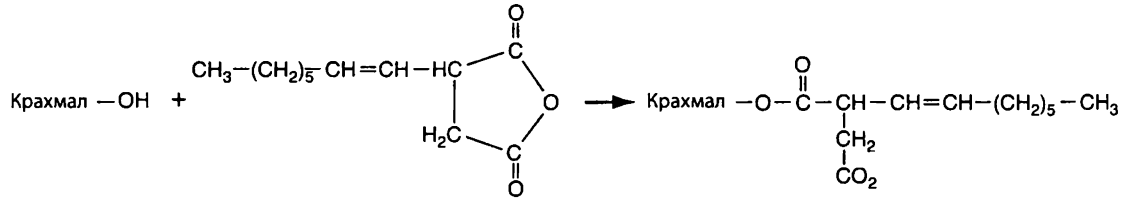


Рис. 3.45. Получение 2-(1-октенил)сукцинилэфира крахмала

Для получения стабилизированных крахмальных продуктов чаще всего применяют гидроксипропилирование. Гидроксипропилкрахмал (Крахмал—O—CH_2—CHOH—CH_3) с низкой степенью этерификации (СЗ 0,02–0,2; верхняя граница является максимально разрешенной) получается при реакции крахмала с пропиленоксидом.

Свойства такого крахмала сходны со свойствами ацетата крахмала, поскольку имеют в структуре полимерной цепи «выпуклости», предотвращающие межмолекулярную ассоциацию и, соответственно, ретроградацию крахмала. Гидроксипропилирование снижает температуру клейстеризации. Гидроксипропилкрахмалы дают прозрачные клейстеры, не подвергающиеся ретроградации и стабильные в циклах замораживания-оттаивания. Применяют их в качестве загустителей и наполнителей. Для улучшения вязкости, особенно в кислых условиях, ацетилированные и гидроксипропилированные крахмалы зачастую бывают сшитыми фосфатными группами.

Фосфаты монокрахмала (натриевые фосфаты моноэфиров крахмала) получают насыщением и реакцией гранул крахмала с раствором триполифосфата натрия или мононатрия ортофосфата. Фосфаты монокрахмала дают стабильные прозрачные клейстеры клейкой текстуры. Вязкость клейстера зависит от концентрации фосфатной соли, продолжительности реакции, температуры и значения pH. При увеличении степени замещения температура клейстеризации снижается, и крахмал набухает в холодной воде при СЗ 0,07. Фосфаты кукурузного крахмала со степенью замещения 0,01–0,03 дают клейстер с вязкостью, прозрачностью, стабильностью и текстурой, аналогичными картофельному крахмалу. Фосфаты крахмала являются хорошими стабилизаторами эмульсий и дают клейстер, стойкий в циклах замораживания-оттаивания.

Большинство модифицированных крахмалов являются сшитыми. Сшивка осуществляется, когда гранулы крахмала вступают в реакцию с бифункциональными реагентами, которые взаимодействуют с гидроксильными группами двух разных молекул данной гранулы. Чаще всего сшивку проводят при получении диэфиров фосфата (см. рис. 3.44). Крахмал реагирует или с $POCl_3$ в щелочной взвеси, или с комплексом

$POCl_3$ триметафосфатом натрия (чаще всего используют первый вариант). Такая сшивка цепочек крахмала упрочняет гранулу и снижает как степень ее набухания, так и последующей дезинтеграции. Благодаря этому гранулы крахмала становятся более стойкими к условиям технологической обработки — высоким температурам, продолжительности варки, низким значениям pH, а также высоким усилиям сдвига при перемешивании, измельчении, гомогенизации и/или перекачке. Клейстеры из сшитых крахмалов более вязкие;* «тяжелые», с более короткой текстурой, они менее подвержены разложению при продолжительной тепловой обработке и низких значениях pH, чем исходные пасты из нативного крахмала. Для проявления заметного эффекта требуется лишь небольшая степень сшивки; при низкой степени сшивки гранулы крахмала набухают обратно пропорционально степени замещения. По мере увеличения степени сшивки гранулы становятся все более стойкими к сдвигу и кислотности, но при этом при варке они хуже дезинтегрируются и увеличивают потребность в энергии для достижения максимальной степени набухания и вязкости. Например, обработка крахмала лишь 0,0025% триметафосфата натрия существенно снижает скорость и степень набухания гранул, увеличивает стабильность клейстера и существенно меняет его профиль вязкости и текстурные характеристики. Обработка же 0,08% триметафосфата ограничивает набухание гранул так, что в условиях выдерживания в горячем состоянии максимальная вязкость никогда не достигается. По мере увеличения степени сшивки крахмал становится все более стойким к кислым условиям, и хотя при нагревании в кислой жидкой среде происходит гидролиз гликозидных связей, молекулы, плотно сшитые друг с другом фосфатной сшивкой, по-прежнему остаются крупными, обеспечивая тем самым повышенную вязкость. В пищевых крахмалах допускается каждая вторая сшивка диэфиром адипиновой кислоты (с пропуском одной связи).

В большинстве сшитых пищевых крахмалов содержится менее одной сшивки на 1000 α-*D*-глюкопиранозильных звеньев. Стремление к более длительной тепловой обработке требует большего сопротивления сдвигу и стойкости к воздействию горячих поверхностей. Сшитые крахмалы также дают стабильный при хранении объем. При стерилизации в автоклаве консервированных пищевых продуктов сшитые крахмалы из-за пониженной скорости клейстеризации и набухания досточно долго сохраняют исходную низкую вязкость, облегчающую теплопередачу и повышение необходимой для стерилизации температуры перед тем, как набухание гранул приведет к желаемой вязкости и образованию требуемых текстуры и суспендирующих свойств. Сшитые крахмалы применяются в производстве консервированных супов, соусов, пудингов и жидкого теста. Сшивка воскового кукурузного крахмала позволяет получать прозрачное желе, прочность которого обеспечивает сохранение формы кусков после разрезания.

Деполимеризация, уменьшение вязкости и понижение температуры клейстеризации могут быть обеспечены окислением гипохлоритом натрия (хлором в щелочном растворе). При окислении также уменьшается ассоциирование молекул амилозы, что приводит к некоторой стабилизации путем введения небольшого количества карбоксилатных и карбонильных групп. Окисленные крахмалы дают менее вязкие и более мягкие гели по сравнению с исходным крахмалом и используются, когда требуются соответствующие свойства. Их также применяют для увеличения клейкости кляра для рыбы и мяса, а также в хлебопечении. Мягкая обработка гипохлоритом натрия, пероксидом водорода или перманганатом калия просто отбеливает крахмал и снижает численность жизнеспособных микроорганизмов.

Так называемые разжиженные крахмалы получают обработкой суспензии нативного или модифицированного крахмала разбавленной минеральной кислотой при температуре ниже температуры клейстеризации. После получения продукта, клейстеризующегося с желаемой вязкостью, кислоту нейтрализуют, продукт промывают и высушивают. Даже при гидролизе лишь нескольких гликозидных связей гранулы крахмала легче дезинтегрируются даже при небольшой степени набухания. Кислотно-модифицированные крахмалы образуют высокопрочные прозрачные гели при небольшой вязкости теста. Разжиженные крахмалы используют в качестве пленкообразователей и адгезивов в производстве таких продуктов, как дражированные орехи, конфеты и там, где требуется прочный гель (например, в жевательных конфетах и в качестве оболочек головок сыра). Чтобы получить особо прочные гели быстрой садки, в качестве исходного материала используют высокоамилозный кукурузный крахмал.

* Из рис. 3.42 следует, что максимальная вязкость достигается в системах с наиболее набухшими гранулами. Сшитые гранулы менее подвержены дезинтеграции в условиях сдвига, то есть после достижения пика вязкости она снижается более медленно. — *Примеч. авт.*

Модифицированные пищевые крахмалы готовят на производстве специально под конкретное применение. К свойствам, которые можно регулировать путем сочетания сшивки, стабилизации и разжижения кукурузного, воскового кукурузного, картофельного, пшеничного и других видов крахмалов, можно отнести следующие свойства (и не только): клейкость, прозрачность, цвет, способность к стабилизации эмульсий и пленкообразованию, высвобождение вкусоароматических соединений, скорость гидратации, влагоудерживающая способность, стойкость к кислотам, нагреванию и охлаждению, стойкость к действию сдвига, температура варки и вязкость (в горячем и холодном виде). К свойствам, которые с помощью крахмала можно придать пищевому продукту, относятся: «ощущение во рту», снижение миграции жиров, текстура, блеск, стабильность и липкость.

Как сшитые, так и стабилизированные крахмалы применяются в производстве консервированных, замороженных и сушеных пищевых продуктов. Они обеспечивают длительный срок годности продуктов детского питания и начинок для пирогов с фруктами (в жестяных и стеклянных банках) Кроме того, они увеличивают стабильность при хранении замороженных полуфабрикатов (пирогов с фруктовой начинкой, кексов и подлив).

3.3.6.11. Крахмал, растворимый в холодной воде

Крахмал, предварительно клейстеризованный и высушенный без чрезмерной ретроградации, можно частично повторно растворять в холодной воде. Такой крахмал называют предварительно клейстеризованным или быстрорастворимым. Предварительная клейстеризация означает, что многие его гранулы расщеплены, то есть правильнее его называть предварительно приготовленным крахмалом или клейстером. Существует два основных подхода к приготовлению предварительно клейстеризованных продуктов. По первому способу взвесь крахмала в воде вводят в пространство между двумя соприкасающимися вращающимися вальцами с паровым обогревом или наносят на один из таких вращающихся вальцов. И в том и в другом случае крахмал клейстеризуется почти мгновенно, причем клейстер на вальцах быстро высыхает. Образовавшуюся пленку отделяют от вальца и растирают в порошок. Полученный крахмальный продукт растворим в холодной воде и образует при перемешивании в воде комнатной температуры вязкую дисперсию (для достижения максимальной вязкости требуется некоторое нагревание). Второй подход предполагает экструдирование, при котором влажные гранулы крахмала клейстеризуются под действием теплоты, образующейся при экструдировании. Рассыпчатый стекловидный экструзионный продукт затем истирают в порошок.

Для получения предварительно клейстеризованных крахмалов можно использовать как химически модифицированные, так и немодифицированные крахмалы. При использовании химически модифицированных крахмалов (см. раздел 3.3.6.10) свойства, обеспечиваемые модификацией, переносятся и на предарительно клейстеризованные продукты (такие свойства, как стабильность в циклах замораживания-размораживания, являются и свойствами предварительно клейстеризованных крахмалов). Подобный крахмал с небольшой степенью сшивки применяют в производстве супов быстрого приготовления, топпингов для пиццы, экструдируемых снеков и зерновых завтраков.

Преимущество предварительно клейстеризованных крахмалов заключается в том, что их можно применять без варки. Как и водорастворимые камеди, тщательно измельченный, предварительно клейстеризованный крахмал при внесении его в воду образует небольшие частицы геля, но при тщательном перемешивании и диспергировании он дает высоковязкие растворы. Более грубо измельченные частицы легче диспергируются и дают менее вязкие дисперсии с ощущением взвешенных частиц, что для некоторых продуктов является желательным. Многие предварительно клейстеризованные крахмалы используют в производстве сухих концентратов, в частности пудингов быстрого приготовления. Такой крахмал при энергичном перемешивании или при смешивании с сахаром или другими сухими ингредиентами быстро диспергируется.

3.3.6.12. Крахмал, набухающий в холодной воде

Интенсивно набухающий в холодной воде гранулированный крахмал получают нагреванием обычного крахмала в 75–90%-ном растворе этилового спирта или путем особой распылительной сушки. Такой продукт некоторые специалисты относят к категории предварительно клейстеризованного или быстрорастворимого крахмала. Разница между таким крахмалом и обычным предварительно клейстеризованным

заключается в том, что при нарушении упорядоченности кристаллов и двойного лучепреломления собственно гранулы остаются незатронутыми. Следовательно, при внесении в воду они разбухают так, как и при варке. Взвесь, образованную при внесении набухшего в холодной воде крахмала в сахарный или глюкозный сироп при интенсивном перемешивании, можно отливать в формы, где она застывает в виде прочного желе, пригодного для нарезания на ломтики. Именно так производят жевательные конфеты. Такой крахмал используют также в производстве десертов и жидкого теста для маффинов с крупными включениями типа ягод, которые иначе осаждались бы на дно формы при выпечке.

3.3.7. Целлюлоза, ее формы и производные

Целлюлоза — это высокомолекулярный линейный нерастворимый гомополимер, состоящий из повторяющихся β-*D*-глюкопиранозильных звеньев, соединенных друг с другом по (1→4)-гликозильным связям (рис. 3.46). Аксиально-экваториальные (1→4)-связи, соединяющие β-*D*-глюкопиранозильные звенья молекул крахмала, образуют спиральную структуру (α-геликс), тогда как экваториально–экваториальные (1→4)-связи, соединяющие β-*D*-глюкопиранозильные звенья целлюлозы, образуют плоскую ленточную структуру, в которой каждое глюкопиранозильное звено цепи перевернуто по сравнению с предшествующим и последующим фрагментом. Вследствие своей плоской и линейной природы молекулы целлюлозы могут соединяться друг с другом через водородные связи на достаточно протяженных участках, формируя поликристаллические волокнистые пучки. Кристаллические области отделены друг от друга и в то же время соединяются участками с аморфной структурой, и именно поэтому целлюлоза нерастворима в воде. Для растворения целлюлозы должно быть одновременно расщеплено большинство из огромного количества водородных связей. Тем не менее целлюлозу можно с помощью процедуры дериватизации превратить в водорастворимые гидроколлоиды [71].

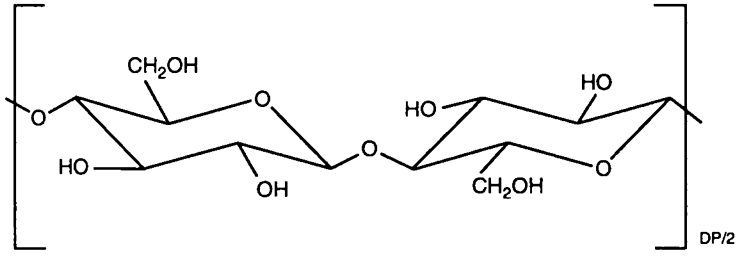


Рис. 3.46. Структурная формула молекулы целлюлозы (повторяющееся звено)

Целлюлоза и ее модифицированные формы — это пищевые волокна, которые не перевариваются и не обладают существенной энергетической ценностью, проходя через желудочно-кишечный тракт человека в неизменном виде. Пищевые волокна играют важную роль в рационе человека (см. раздел 3.4).

Очищенная порошкообразная целлюлоза поставляется в качестве ингредиента пищевых продуктов. Высококачественную целюлозу получают из деревесины путем ее измельчения и последующей очистки. Для пищевого применения не требуется целлюлоза химической степени чистоты, поскольку целлюлозные клеточные стенки являются компонентами всего растительного сырья. У пищевой очищенной целлюлозы нет цвета, запаха и она не контаминирована микроорганизмами. Целлюлозный порошок чаще всего вносят в хлебобулочные изделия в качестве некалорийного наполнителя. Такие низкокалорийные хлебобулочные изделия не только характеризуются повышенным содержанием пищевых волокон, но и дольше удерживают влагу и остаются свежими.

3.3.7.1. Микрокристаллическая целлюлоза

Очищенную нерастворимую целлюлозу, которую называют микрокристаллической целлюлозой (МКЦ), получают путем частичного гидролиза очищенной целлюлозы после ее отделения от древесной массы. Гидролиз осуществляется в аморфных областях исходного материала. Молекулы целлюлозы — это довольно жесткие линейные цепи, состоящие примерно из 3000 β-*D*-глюкопиранозильных звеньев. Они легко ассоциируются с образованием протяженных связанных областей, но эти длинные и громоздкие цепи по всей своей протяженности не выровнены. Конец кристаллической области представляет собой просто совокупность неупорядоченных молекул целлюлозы, расположенных более хаотично и образующих аморфную область. При кислотном гидролизе очищенной древесной массы кислота проникает в менее плотные гидратируемые аморфные области, в которых молекулы целлюлозы обладают большей

свободой, и вызывает их гидролитическое расщепление, высвобождая отдельные бахромчатые кристаллиты [58].

Промышленно производятся два типа термо- и кислотостойких МКЦ. Порошкообразная МКЦ — это продукт распылительной сушки, которая позволяет получить пористые микрокристаллические агрегаты. Такая МКЦ применяется в качестве носителя вкусоароматических соединений и антислеживающего вещества для тертого сыра. Второй тип, коллоидная МКЦ, водорастворима и обладает технологическими свойствами, близкими к свойствам водорастворимых камедей. Для получения коллоидной МКЦ к полученному гидролизом продукту прикладывают значительную механическую энергию для разрыва ослабленных микрофибрилл и получения агрегатов нужного размера (менее 0,2 мкм). Чтобы предотвратить повторное слипание этих агрегатов при сушке, добавляют натриевую КМЦ (см. раздел 3.3.7.2), ксантановую камедь (см. раздел 3.3.9) или альгинат натрия (см. раздел 3.3.11). Эти анионные гидроколлоидные добавки способствуют повторному диспергированию и выполняют роль барьера для реассоциации, придавая частицам стабилизирующий отрицательный заряд.

Основные функции коллоидной МКЦ — это стабилизация пен и эмульсий, особенно при высокотемпературной обработке; образовывание гелей мазеобразной консистенции (МКЦ не растворяется и не формирует областей с межмолекулярной связью, она скорее образует пространственную сетку из гидратированных микрокристаллов); повышение термостойкости пектиновых и крахмальных гелей; улучшение адгезии; замещение жиров и масел в салатных дрессингах и мороженом; регулирование роста кристаллов льда. МКЦ стабилизирует эмульсии и пены путем адсорбции к поверхности раздела фаз и упрочнения межфазной пленки. Она широко применяется в производстве мороженого пониженной жирности и других замороженых десертов.

3.3.7.2. Карбоксиметилцеллюлоза

Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ, см. табл. 3.5) широко и в больших объемах используется в качестве пищевого загустителя. Путем обработки очищенной древесной массы 18%-ным раствором гидроксида натрия получают щелочную целлюлозу, при реакции которой с натриевой солью хлоруксусной кислоты образуется натриевая соль карбоксиметилового эфира (целлюлоза—O—CH_2—$CO^-{}_2Na^+$). Наиболее широко промышленно применяется КМЦ со степенью замещения 0,4–0,8 (в качестве пищевого ингредиента чаще всего используют КМЦ со степенью замещения 0,7).

Поскольку КМЦ состоит из длинных, довольно жестких молекул, отрицательно заряженных из-за наличия многочисленных ионизированных карбоксильных групп, возникают силы электростатического отталкивания. Это приводит к тому, что молекулы КМЦ в растворе имеют вытянутую форму, причем расположенные рядом молекулы отталкиваются. В результате растворы КМЦ являются и высоковязкими, и стабильными. КМЦ поставляется с различной вязкостью и стабилизирует белковые дисперсии, особенно вблизи изоэлектрической точки белков [14, 33].

3.3.7.3. Метил- и гидроксипропилметилцеллюлозы

Для получения метилцеллюлозы (МЦ, табл. 3.5) щелочную целлюлозу обрабатывают метилхлоридом, вводя в нее метоксигруппы (целлюлоза—O—CH_3). У многих представителей этого семейства гидроколлоидов имеются также гидроксипропилоксигруппы (целлюлоза—O—CH_2—CHOH—CH_3). Гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) получают реакцией щелочной целлюлозы с пропиленоксидом и метилхлоридом. Степень замещения метильными группами промышленно выпускаемой МЦ составляет 1,1–2,2. Молярное замещение (МЗ)* гидроксипропилоксигруппами промышленно выпускаемой ГПМЦ составляет 0,02–0,3. Представителей данного семейства гидроколлоидов (и МЦ, и ГПМЦ) обычно для простоты

* Значение молярного или мольного замещения свидетельствует о среднем количестве молей заместителя, присоединенных к гликозильному звену полисахарида. Поскольку реакция гидроксильной группы с пропиленоксидом приводит к образованию новой гидроксильной группы, с которой пропиленоксид может далее реагировать, могут образовываться цепочки полипропиленоксида, каждая из которых оканчивается свободной гидроксильной группой. Поскольку с одним гексапиранозильным звеном могут прореагировать более трех молей пропиленоксида, используется понятие именно МЗ, а не просто степень замещения. — *Примеч. авт.*

обозначают МЦ. Оба продукта растворимы в холодной воде, так как метильные и гидроксипропильные эфирные группы цепи выступают из цепи, препятствуя межмолекулярной ассоциации, характерной для целлюлозы [24, 25].

Поскольку небольшое число добавленных эфирных групп распределено вдоль основной цепи и улучшает растворимость в воде, они одновременно снижают степень гидратации основной цепи из-за замены хорошо связывающих воду гидроксильных групп менее полярными эфирными группами, что придает этому семейству целлюлозных продуктов уникальные свойства. Эфирные группы ограничивают способность молекул к растворению до такого предела, что они находятся по отношению к растворимости в воде в пограничном состоянии. При нагревании водного раствора гидратирующие полимер молекулы воды отделяются от него, и степень гидратации снижается настолько, что возрастает межмолекулярная ассоциация (возможно, под действием Ван-дер-Ваальсовых сил) и происходит гелеобразование. Снижение температуры геля позволяет молекулам снова гидратироваться и раствориться, что делает подобное гелеобразование обратимым.

Из-за наличия эфирных групп цепочки молекул гидроколлоида обладают определенной поверхностной активностью и адсорбируются к поверхности раздела фаз, что способствует стабилизации эмульсий и пен. МЦ также можно использовать для снижения содержания жира в пищевых продуктах по двум механизмам:

придание продукту свойств, аналогичных свойствам жира, при снижении содержания последнего в продукте;

снижение поглощения жира продуктами, подвергающимися жарке во фритюре (в этом случае гелеобразная структура, образующаяся в ходе гелеобразования при нагревании, образует барьер для миграции жира, удерживает влагу и действует как влагосвязывающее вещество).

3.3.8. Гуаровая камедь и камедь рожкового дерева

Гуаровая камедь и камедь рожкового дерева (КРД) — это важнейшие полисахариды-загустители (см. табл. 3.5). Гуаровая камедь по сравнению с другими натуральными, промышленно выпускаемыми камедями обеспечивает получение наибольшей вязкости. И гуаровая камедь, и КРД представляют собой измельченный эндосперм семян. Основной его компонент — это галактоманнаны, состоящие из молекул, образованных из β-*D*-маннопиранозильных звеньев, присоединенных друг к другу по (1→4)-связям. В структуру молекул входят также однозвенные α-*D*-галактопиранозильные боковые ответвления, присоединенные к О-6 (рис. 3.47). Большую часть гуаровой камеди составляет специфический полисахарид гуаран, в котором более половины *D*-маннопиранозильных звеньев основной цепи содержат α-*D*-галактопиранозильные заместители [27, 28, 38].

У галактоманнана из КРД повторяющиеся звенья менее разветвлены, чем у гуарана, и его структура более нерегулярна. Длинные участки, состоящие примерно из 80 немодифицированных *D*-маннозных звеньев, чередуются с участками примерно из 50 звеньев, большинство из которых имеют α-D-галактопиранозильные группы, связанные с ними гликозидными связями в позиции О-6.

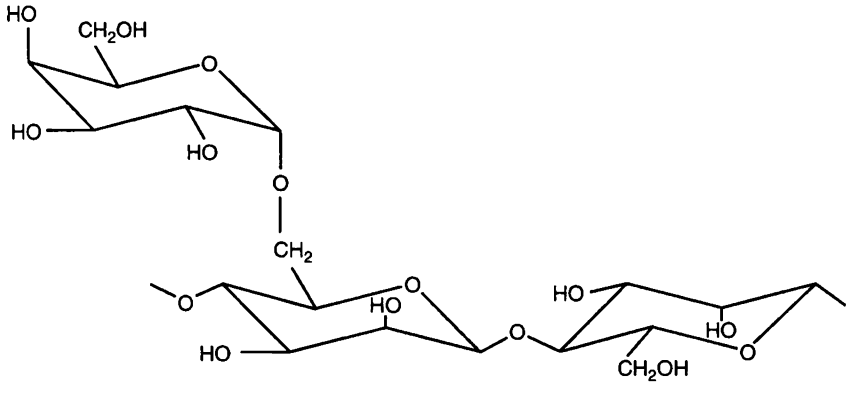


Рис. 3.47. Повторяющееся звено молекулы галактоманнана

Из-за указанных структурных отличий гуаровая камедь и КРД обладают разными физическими свойствами, несмотря на то что обе камеди являются галактоманнанами и состоят из длинных, достаточно жестких молекул. Эта особенность обеспечивает высокую вязкость их

растворов. Поскольку в гуаране галактозильные звенья распределены вдоль основной цепи довольно равномерно, существует мало участков, пригодных для образования связанных зон, тогда как КРД с ее длинными фрагментами «оголенных» цепей способна их образовывать. Молекулы КРД взаимодействуют со спиральными структурами ксантановой камеди (см. раздел 3.3.9, рис. 3.48;) и каррагинана (см. раздел 3.3.10), образуя связанные зоны и прочные гели.

Гуаровая камедь позволяет экономически выгодно загущать различные пищевые продукты и зачастую применяется в сочетании с другими пищевыми камедями (например, в производстве мороженого, где ее вносят совместно с КМЦ (см. раздел 3.3.7.2), каррагинаном и КРД.

КРД обычно используется в производстве тех же продуктов, где используется гуаровая камедь. Около 85% КРД применяют в производстве молочных и замороженных десертов. По отдельности ее используют редко, чаще в сочетании с другими камедями типа КМЦ, каррагинана, ксантановой и гуаровой камедями. В сочетании с к-каррагинаном и ксантановой камедью КРД применяют для обеспечения синергического гелеобразования. Типичный уровень внесения КРД — 0,05–0,25%.

3.3.9. Ксантановая камедь

Полисахарид, именуемый ксантаном, продуцируется *Xanthomonas campestris* (бактерией, обычно присутствующей на листьях растений семейства крестоцветных). Это соединение получают в больших бродильных чанах и широко используют в качестве пищевой камеди, называемой ксантановой (см. табл. 3.5).

Боковые ответвления молекулы ксантана идентичны боковым ответвлениям целлюлозы (рис. 3.48, ср. с рис. 3.46). В молекуле ксантана каждое второе β-*D*-глюкопиранозильное звено молекулы целлюлозы присоединено в О-3 позиции к β-*D*-маннопиранозил-(1→4)-β-*D*-глюкуронопиранозил-(1→2)-6-О-ацетил-β-D-маннопиранозильному звену трисахарида.* Примерно к половине концевых β-*D*-маннопиранозильных звеньев присоединена пировиноградная кислота в качестве 4,6-циклического ацеталя. Боковые звенья этого трисахарида взаимодействуют с основной цепью и делают молекулу довольно жесткой. Молекулярная масса ксантана обычно около 2 10^6, хотя имеются данные и о намного большей молекулярной массе (предположительно вследствие агрегации молекул) [32, 47].

Ксантановая камедь обладает синергизмом с гуаровой камедью, увеличивая вязкость раствора, а с КРД образует термообратимый гель (рис. 3.49).

Ксантановая камель широко используется в пищевой промышленности, поскольку обладает следующими важными свойствами: растворимостью в холодной и горячей воде; образованием высоковязких растворов при низких концентрациях; отсутствием заметного изменения вязкости раствора при температурах от 0 до 100 °С (уникальное для пищевых гидроколлоидов свойство); растворимостью и стабиль-

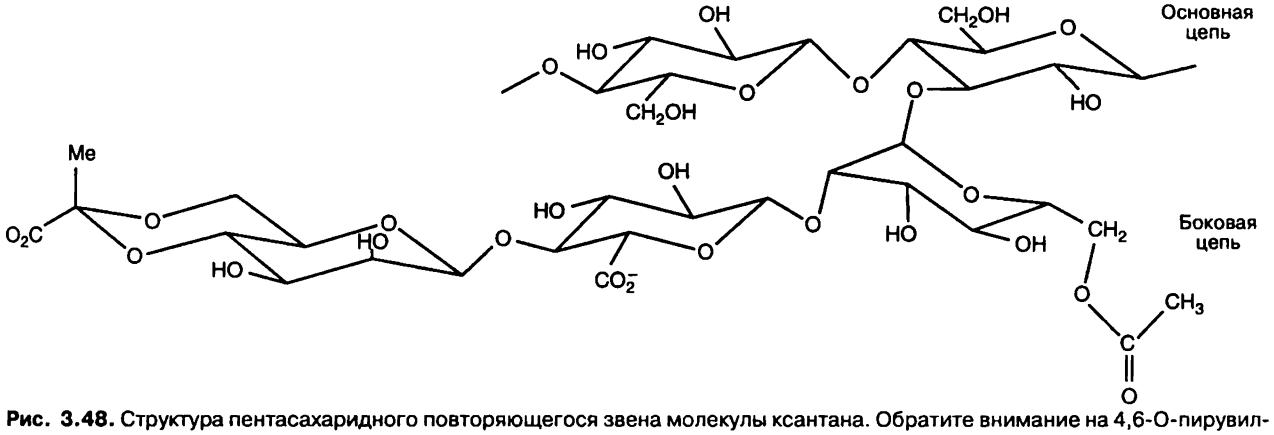


Рис. 3.48. Структура пентасахаридного повторяющегося звена молекулы ксантана. Обратите внимание на 4,6-О-пирувил-*D*-маннопиранозильные нередуцирующие концевые группы трисахаридной боковой цепи. Как правило, около половины боковых цепей пирувилированы

* Гетероглюканы бактериального происхождения в отличие от гетероглюканов растительного происхождения характеризуются регулярной, повторяющейся структурой звеньев. — *Примеч. авт.*

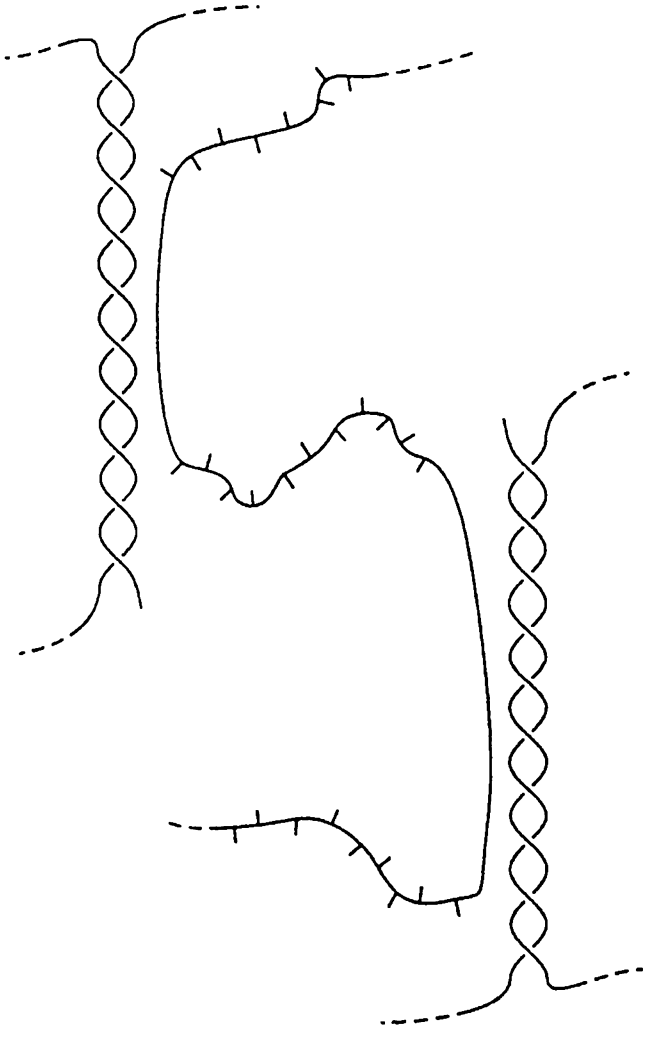


Рис. 3.49. Схематическое представление гипотетического взаимодействия молекул КРД с двухспиральными участками молекул ксантановой камеди или каррагинана с образованием трехмерной сети и геля

ностью в кислой среде; отличная совместимость с солью; образование гелей в сочетании с КРД; хорошие стабилизирующие свойства в суспензиях и эмульсиях; обеспечение стабильности пищевых продуктов в циклах замораживания-оттаивания. Необычные и очень полезные свойства ксантановой камеди обусловлены жесткостью структуры и вытянутой природой ее молекул, которые, в свою очередь, являются следствием наличия линейной целлюлозной основной цепи, жесткость которой усиливается и защищается анионными трисахаридными боковыми ответвлениями.

Ксантановая камедь идеально подходит для стабилизации водных дисперсий, суспензий и эмульсий. Поскольку вязкость ее растворов под воздействием температуры изменяется очень мало, то есть эти растворы не загущаются в процессе охлаждения, она незаменима при загущении и стабилизации таких продуктов, как салатные дрессинги (заливки) и шоколадный сироп. Такие продукты при выемке их из холодильника должны литься так же легко, как и при комнатной температуре. Кроме того, ксантановую камедь добавляют в подливы, которые не должны быть слишком густыми в холодном виде или слишком жидкими в горячем. В обычной салатном дрессинге ксантановая камедь выполняет функции и загустителя, и стабилизатора, причем ее используют и для суспензии частиц, и для эмульсий типа «масло-в-воде». Эту камедь также применяют в качестве загустителя и суспендирующего агента в производстве обезжиренных низкокалорийных соусов, причем и в жирные, и в не содержащие жир соусы ее практически всегда вносят в сочетании с альгинатом пропиленгликоля (АПГ, см. раздел 3.3.11), который снижает вязкость ксантансодержащих систем и уменьшает их псевдопластичность. Совместно они обеспечивают требуемые текучие свойства, обусловленные псевдопластичностью ксантановой камеди, и ощущение кремообразной (сливочной) текстуры, обусловленное непсевдопластичным раствором.

3.3.10. Каррагинаны, агар и фурцеллеран

Понятием «каррагинаны» обозначают группу или семейство сульфатированных галактанов, экстрагируемых из красных морских водорослей разбавленными растворами щелочей с получением, как правило, натриевой соли каррагинана. Каррагинаны — это смесь нескольких родственных сульфатированных галактанов (см. табл. 3.5). Они представляют собой линейные цепи, состоящие из *D*-галактопиранозильных звеньев, связанных чередующимися (1→3)-α-*D*- и (1→4)-β-*D*-гликозидными связями, причем у большинства сахаридных звеньев одна или две сульфатные полуэфирные группы этерифицированы у атома C_2 и/или C_6 до гидроксильных групп. Тем самым содержание сульфатов в таких соединениях составляет 15–40%. Галактопиранозильные звенья зачастую содержат 3,6-ангидридные кольца. Основные виды каррагинанов обозначают как κ- (каппа), ι- (йота) и λ- (лямбда) каррагинаны. Дисахаридные звенья, наиболее

характерные для каждого типа каррагинанов, представлены на рис. 3.50. Экстрагированные карригинаны представляют собой смесь негомогенных полисахаридов. В зависимости от исходной смеси разных видов красных водорослей получают более 100 производных каррагинана с различными свойствами, состав которых зависит от соотношения трех основных типов (каппа-, йота- и лямбда-) каррагинана. Для производства каррагинана в порошке к нему для нормализации можно добавить ионы калия или сахар [22, 57].

Каррагинаны растворяются в воде с образованием очень вязких растворов, стабильных в широком диапазоне значений pH, так как даже в сильнокислых растворах сульфатные полуэфирные группы всегда ионизированы и придают молекуле отрицательный заряд. Тем не менее, в горячих кислых растворах каррагинаны подвергаются деполимеризации, в связи с чем при использовании каррагинана подобных условий следует избегать.

Сегменты молекул каппа- и йота-карагинанов имеют вид двойных спиралей из параллельных цепочек. В присутствии ионов калия или кальция при охлаждении горячего раствора, содержащего фрагменты таких двойных спиралей, образуется термически обратимый гель. В воде гелеобразование может происходить уже при концентрации 0,5%. При охлаждении раствора каппа-каррагинана в присутствии ионов калия образуется твердый хрупкий гель. Ионы кальция меньше способствуют гелеобразованию, и одновременное присутствие ионов калия и кальция дает высокопрочный гель. Гели, образованные каппа-каррагинаном, являются наиболее прочными из всех каррагинановых гелей и склонны к синерезису, поскольку удлиняется зона связывания внутри структуры молекулы, однако присутствие других камедей замедляет синерезис.

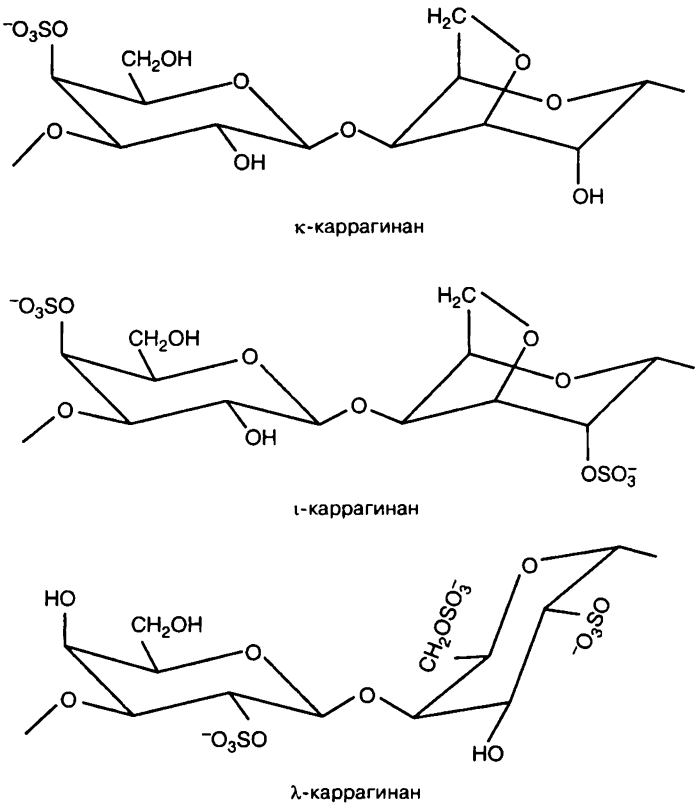


Рис. 3.50. Упрощенные структурные формулы звеньев κ-, ι- и λ-каррагинана

Йота-каррагинаны более растворимы, чем каппа-каррагинаны, однако в холодной воде растворимы только производные их натриевых солей. Йота-каррагинан лучше всего образует гель в присутствии ионов кальция. При этом получается мягкий эластичный гель, стабильный в циклах замораживания-оттаивания и не дающий синерезиса (последнее объясняется тем, что йота-каррагинаны более гидрофильны и образуют меньше зон связывания, чем каппа-каррагинаны).

Гелеобразование растворов каппа- и йота-каррагинанов при охлаждении происходит вследствие того, что из-за нерегулярности структуры линейные молекулы не способны образовывать безразрывные двойные спирали. Линейные спиралевидные фрагменты ассоциируются в трехмерный гель в присутствии соответствующих катионов (рис. 3.51). Все соли лямбда-каррагинанов растворимы и не образуют гель.

Если в составе молекул каррагинана, особенно каппа-карагинана, имеются фрагменты двойных спиралей, то образуются зоны связывания с «оголенными» (незамещенными) фрагментами молекул КРД, что приводит к образованию прочных хрупких гелей, для которых характерен синерезис. Образование таких гелей происходит при концентрациях, составляющих треть от концентрации, необходимой для получения чистого каппа-каррагинанового геля.

Каррагинаны получили широкое распространение благодаря их способности образовывать гели с молоком и водой. Смеси различных типов каррагинана используются для производства широкого ассорти-

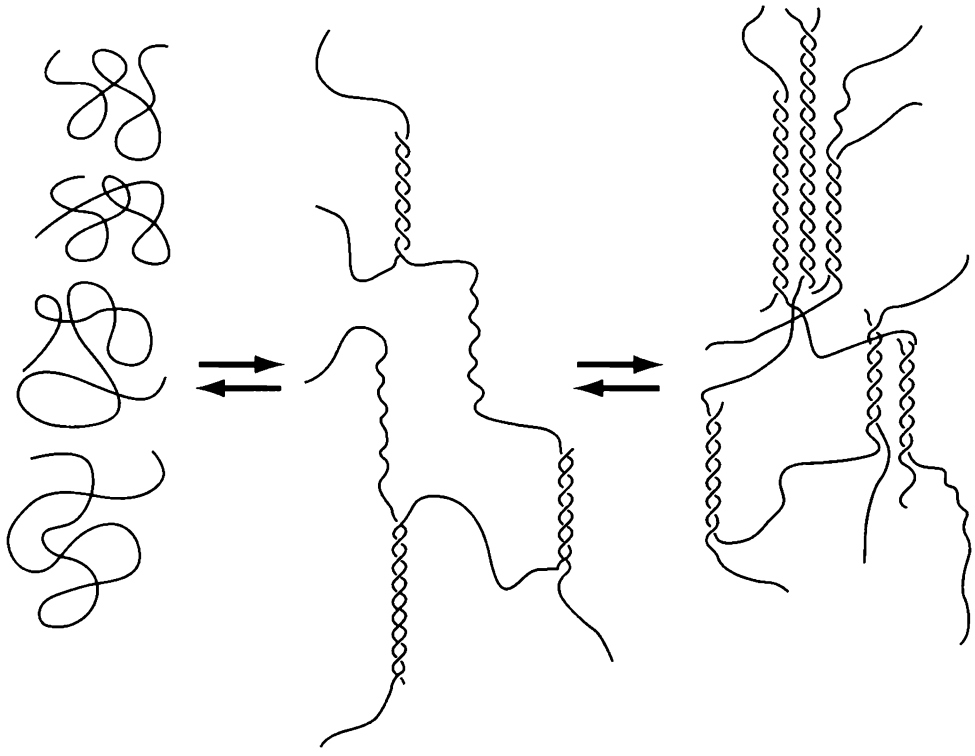


Рис. 3.51. Гипотетический механизм гелеобразования каппа- и йота-каррагинанов. В горячих растворах молекулы каррагинана переплетены, а при их охлаждении молекулы «разматываются» в двойные спирали. Дальнейшее охлаждение раствора приводит к сближению фрагментов двойных спиралей с помощью ионов кальция и калия

мента продуктов, которые стандартизуют путем внесения разных количеств сахарозы, глюкозы (декстрозы), буферных солей и желирующих добавок типа хлорида калия. Промышленно выпускаемые пищевые продукты представлены самыми разными видами гелей — прозрачными и мутными, жесткими и эластичными, прочными и мягкими, термостойкими и термообратимыми, с синерезисом и без него. Гели каррагинанов не требуют холодильного хранения, поскольку они не разжижаются при комнатной температуре и стабильны в циклах замораживания-оттаивания.

Одним из полезных свойств каррагинанов является их способность взаимодействовать с белками, в особенности с молочными. Комплекс к-каррагинана с мицеллами к-казеина дает слабый тиксотропный текучий гель. Загущающее действие к-каррагинанов в молоке в 5–10 раз сильнее, чем в воде. Это свойство используется в производстве шоколадного молока, где структура тиксотропного геля позволяет предотвратить осаждение частиц какао. Для достижения такой стабильности требуется внесение лишь 0,025% каррагинана. Кроме того, это свойство используется в производстве мороженого, сгущенного молока, смесей для детского питания, взбитых сливок, стабильных в циклах замораживания-оттаивания, а также эмульсий, в которых вместо молочного жира применяются растительные жиры.

Синергизм к-каррагинана и КРД (см. рис. 3.49) позволяет получать более эластичный и упругий гель с меньшим синерезисом, чем гель, получаемый с использованием только калиевой соли к-каррагинана. Сочетание КРД и к-каррагинана по сравнению с использованием только к-каррагинана дает более стабильную текстуру, способную удерживать пузырьки воздуха в мороженом, но при этом ухудшается его разжевываемость, в связи с чем для получения геля с более мягкой текстурой в мороженое добавляют гуаровую камедь.

При внесении 1–2% к-каррагинана холодные ветчины и роллы из мяса птицы удерживают на 20–80% больше рассола, облегчается также их нарезка. Покрытие мясных продуктов каррагинаном обеспечивает их механическую защиту и, кроме того, он служит носителем специй и вкусоароматических добавок.

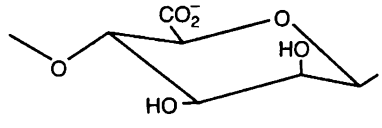
Каррагинаны иногда добавляют к имитаторам мяса, получаемым из казеина и растительных белков. Каррагинаны используют также для удерживания влаги при кулинарной обработке, в том числе для обеспечения мягкости мясных продуктов, в частности, сосисок и вареных колбас. Внесение κ- или ι-карагинана в форме их натриевых ионов, а также переработанного каррагинана из водорослей *Euchema* (*PES, processed eucheuma seaweed,* см. ниже) в говяжий фарш улучшают текстуру и качество котлетной массы. Обычно для обеспечения мягкости продукта используют жиры, но благодаря связыванию каррагинана с белком и его высокому сродству к воде зачастую каррагинан используют в производстве постных продуктов в качестве заменителя животных жиров.

Производится и применяется также мука из водорослей щелочной обработки, которую прежде называли *PES*-каррагинаном, а в настоящее время чаще называют просто каррагинаном. Для получения *PES*-каррагинана красные морские водоросли обрабатывают раствором гидроксида калия. Так как в этих водорослях содержатся те каррагинаны, калиевые соли которых нерастворимы, молекулы каррагинана не солюбилизируются и не экстрагируются. В ходе такой обработки из растительного сырья удаляются низкомолекулярные растворимые соединения, а остаток высушивают и измельчают в порошок. Таким образом *PES*-каррагинан представляет собой композитное вещество, состоящее не только из молекул каррагинана, экстрагируемых разбавленным гидроксидом натрия, но и из других компонентов клеточных стенок.

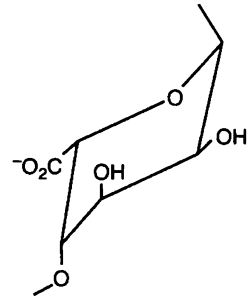
Две другие пищевые камеди, агар и фурцеллеран (называемый иногда «датским агаром»), которые также получают из красных морских водорослей, обладают свойствами, сходными с каррагинанами. Подобно гелланновой камеди (см. раздел 3.3.13), агар используется главным образом в виде добавки к хлебопекарным смесям — он способствует удержанию влаги в готовом продукте, не увеличивая при этом вязкость теста, так как при комнатной температуре он не растворим в воде.

3.3.11. Альгинаты

Промышленные альгинаты (альгины*) — это соли (чаще всего натриевые) линейной полиуроновой альгиновой кислоты, получаемые из бурых морских водорослей (см. табл. 3.5). Альгиновая кислота состоит из двух мономеров: β-*D*-маннопиранозилуроновой кислоты и α-*L*-гулопиранозилуроновой кислоты. Эти мономеры присутствуют как в гомогенных областях (образованных тем или другим одним мономером), так и областях со смесью мономеров. Фрагменты, состоящие только из *D*-маннуронопиранозильных звеньев, называют *M*-блоками, а фрагменты, образованные только *L*-гулуронопиранозильными звеньями — *G*-блоками. *D*-Маннуронопиранозильные звенья находятся в $^4C_1$-конформации, а *L*-гулуронопиранозильные — в $^1C_4$ конформации (см. раздел 3.1.2 и рис. 3.52), что дает большое разнообразие цепей в разной конформации. Участки *M*-блоков за счет образования экваториальных связей — плоские, похожие на ленту и напоминают структуру целлюлозы (см. раздел 3.3.7). Участки же *G*-блоков имеют складчатую структуру из-за образования аксиальных гликозидных связей. Причиной различия свойств альгинатов из различных видов водорослей являются вариации в долях участков с блоками разного типа. Из альгинатов с более высокой долей *G*-блоков получаются высокопрочные гели [11, 34].



βMan*p*A



α-L-Gul*p*A

Рис. 3.52. Звенья β-*D*-маннопиранозилуроновой кислоты (βMan*p*A) в конформации $^4C_1$ и α-*L*-гулопиранозилуроновой кислоты (αLGul*p*A) в конформации $^1C_4$

Растворы альгинатов натрия обладают очень большой вязкостью. Кальциевые соли альгинатов нерастворимы из-за взаимодействия ионов кальция с участками цепи, состоящими из *G*-блоков. Ионы кальция оказываются «зажатыми» в полостях, образуемых цепочками *G*-блоков,

* Термин «альгины» применяется в основном в косметике — это производное альгиновой кислоты из бурых водорослей семейства ламинарий, гелеобразное вещество, структурированное соединение с увлажняющим, разглаживающим и моделирующим эффектом. — *Примеч. ред.*

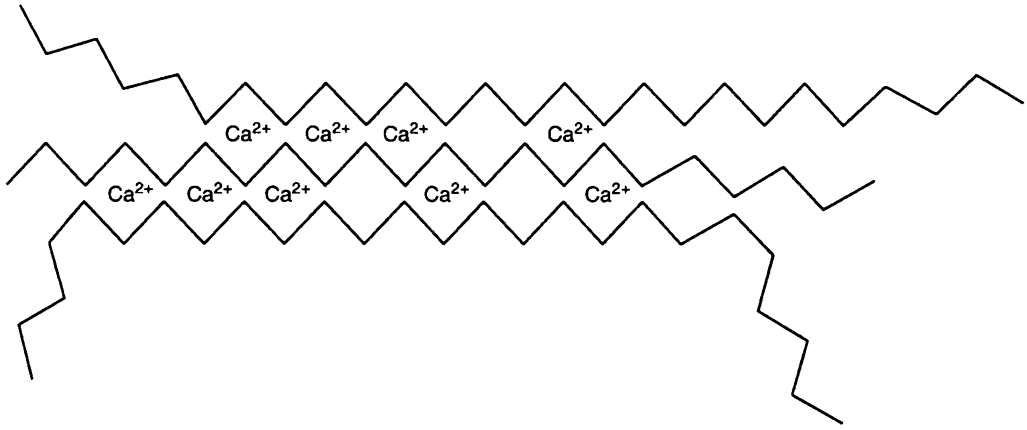


Рис. 3.53. Вид возможной структуры зон связывания между участками *G*-блоков трех молекул альгината и ионами кальция

в результате чего образуется структура, в которой зона связывания окружена ионами кальция (расположенных наподобие яиц в секциях лотков из литой бумажной массы, рис. 3.53). Прочность геля зависит от содержания *G*-блоков в альгинате и от концентрации ионов кальция.

Альгинаты пропиленгликоля (пропиленгликольальгинаты, ПГА) получают при реакции увлажненной альгиновой кислоты с пропиленоксидом с образованием неполного эфира, в котором этерифицированы 50–85% карбоксильных групп. Растворы ПГА гораздо более стойки при низких значениях pH и в присутствии поливалентных катионов, в том числе ионов кальция и белков, чем растворы неэтерифицированных альгинатов, поскольку этерифицированные карбоксильные группы не ионизируются. Кроме того, пропиленгликольная группа представляет собой своеобразный «выступ» в цепи молекулы, что препятствует ассоциации молекул. Именно поэтому растворы ПГА стабильны. Вследствие их стабильности относительно ионов кальция ПГА можно использовать в производстве молочных продуктов. Благодаря гидрофобности пропиленгликольных групп молекулы ПГА приобретают слабовыраженную поверхностную активность, то есть им становятся присущи пенообразующие и эмульгирующие свойства, а также способность стабилизировать эмульсии. ПГА применяют в тех случаях, когда требуются кислотостойкость, стабильность относительно ионов кальция (например, в молочных продуктах) или поверхностно-активные свойства — в частности, его применяют в качестве загустителя салатных заправок (см. табл. 3.5), а в сочетании с ксантановой камедью в производстве низкокалорийных салатных заправок (см. раздел 3.3.9).

Альгинаты чаще всего используют как пищевые ингредиенты благодаря их способности к гелеобразованию, однако они находят применение и в тех случаях, когда необходимо обеспечить высокую вязкость при низкой концентрации (особенно они эффективны в условиях невысоких концентраций ионов кальция). При использовании ПГА часть ионов кальция по-прежнему участвует в сшивке полимера через оставшиеся карбоксильные группы, в результате чего раствор загущается, но не желируется.

Гели альгината кальция получают путем диффузного загущения, внутреннего загущения или загущения при охлаждении. Диффузное загущение используют для получения структурированных пищевых продуктов, примером которых могут служить структурированные полоски паприки для фарширования зеленых оливок. При производстве таких полосок пюре из паприки сначала перемешивают с водой и небольшим количеством гуаровой камеди, используемой для промежуточного загущения, а затем — с альгинатом натрия. Полученную смесь подают на ленту конвейера и желируют путем добавления ионов кальция. Загустевшую массу нарезают на тонкие полоски, которые затем помещают в оливки. Изготовление фруктовых пюре, смесей и желейного декора в виде фруктов путем внутреннего загущения подразумевает медленное высвобождение ионов кальция в смеси. Такого медленного высвобождения добиваются комбинированным действием слаборастворимой органической кислоты и какого-либо комплексообразователя на нерастворимую кальциевую соль. Загущение при охлаждении осуществляют путем смешивания компонентов, необходимых для образования геля, при температуре, превышающей температуру плавления геля, с последующим охлаждением смеси. Альгинатные гели довольно термостойки, для них, как правило, не

характерен синерезис. В отличие от желатиновых гелей альгинатные не термообратимы и, подобно гелям из каррагинана, не требуют холодильного хранения. Альгинатные гели можно использовать как десертные желе, которые не разжижаются даже при высоких комнатных температурах, но они не так тают во рту, как желатиновое желе.

Альгиновая кислота, которую можно рассматривать как раствор альгината с пониженным значением pH, используется (в присутствии ионов кальция или без них) для приготовления мягких тиксотропных нетающих гелей (см. табл. 3.5).

3.3.12. Пектины

Промышленно выпускаемые пектины — это гликаногалактуронаны (поли[α-*D*-галактопиранозилуроновые кислоты], галактуроногликаны) с различным содержанием метоксильных групп (см. табл. 3.5). Нативные молекулы пектина присутствуют в клеточной оболочке и межклеточных слоях всех наземных растений, и из них получают коммерческие пектины с более сложной молекулой из-за метоксилирования гликаногалактуронанов в ходе экстракции их кислотой. Коммерческие пектины получают в основном из кожуры цитрусовых и из яблочных выжимок. Легче всего выделить пектин из кожуры лимона и лайма (как правило, он наиболее высокого качества). Пектины обладают уникальным свойством образовывать пастообразные гели в присутствии сахара и кислоты или ионов кальция (основное применение пектинов основано именно на этом их свойстве).

Состав и свойства пектинов сильно варьируют в зависимости от сырья, технологии их получения и последующей обработки. При экстракции слабой кислотой происходит частичная гидролитическая деполимеризация и гидролиз метоксильных групп, и, следовательно, термин «пектины» следует относить к некоторому семейству веществ. Понятие «пектины» обычно используют как обобщающее название тех водорастворимых производных полигалактуроновой кислоты (гликаногалактуронанов) с разным содержанием метоксильных групп и различной степенью нейтрализации, которые способны образовывать гели. Во всех природных пектинах некоторое количество карбоксильных групп этерифицировано до метоксильных, и в зависимости от условий обработки оставшиеся карбоксильные группы могут частично или полностью нейтрализоваться, то есть быть представлены карбоксильными группами натрия, калия или аммония. Как правило, нейтрализованные карбоксильные группы бывают представлены натриевыми солями.

По определению производные, в которых более половины карбоксильных групп этерифицированы до метокси-групп (—$COOCH_3$), называются пектинами с высокой степенью метилирования или высокометоксилированными пектинами (рис. 3.54); оставшиеся карбоксильные группы могут быть представлены как смесь свободной кислоты (—COOH) или ее соли (например, —COO^-Na^+). Производные, в которых менее половины карбоксильных групп этерифицированы в метоксильные, называют пектинами с низкой степенью метоксилирования или низкометоксилированными пектинами. Процентное отношение карбоксильных групп, этерифицированных метанолом, называется степенью этерификации (СЭ) или степенью метоксилирования (СМ). Обработка производного пектина аммиаком (как правило, в растворе метанола) превращает метоксильные группы в карбоксиамидные (15–25%). При этом согласно определению образуется низкометоксилированный пектин. Такие продукты называют также амидированными низкометоксилированными пектинами [10, 49].

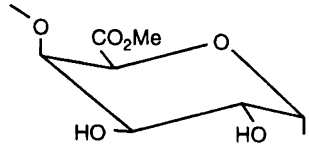


Рис. 3.54. Превалирующее мономерное звено высокометоксилированного пектина (ВМ-пектина)

Основным и важнейшим свойством молекул всех пектинов является линейная структура их молекул, состоящая из остатков α-*D*-галактопиранозилуроновой кислоты, связанных по 1,4-связи. В этой цепи могут также присутствовать нейтральные сахара, преимущественно *L*-рамноза. В пектине яблок и цитрусовых мономеры α-*L*-рамнопиранозила расположены в молекуле полисахарида через достаточно регулярные промежутки. Мономеры *L*-рамнопиранозила обеспечивают необходимую нерегулярность структуры, что позволяет ограничить размер зоны связывания и усилить способность к гелеобразованию (в отличие от выпадения осадка и полной нерастворимости). У некоторых пектинов имеются в структуре ковалентно связанные, сильноразветвленные мономеры арабиногалактана и/или короткие боковые ответвления из *D*-ксилозы. Наличие боковых цепей является также фактором, ограничивающим степень ассоциации мо-

лекул полимера. Зоны связывания образуются между регулярными неразветвленными молекулами пектина в тех случаях, когда отрицательный заряд карбоксильных групп нейтрализован (например, кислотой), уменьшена степень гидратации молекул (введением в раствор высокометоксилированного пектина дополнительного растворенного вещества, которым почти всегда выступает сахар) и/или когда молекулы полимера связаны мостиками из ионов кальция.

Растворы высокометоксилированного пектина образуют гели в присутствии кислоты или сахара. Поскольку растворы пектина имеют низкое значение pH, заряженные карбоксильные группы с высокой степенью гидратации утрачивают заряд и становятся слабогидратированными. В результате потери заряда и снижения степени гидратации молекулы полимера становятся способными к ассоциации на более длинных участках, образуя зоны связывания и сетки из полимерных звеньев, в которых удерживается водный раствор. Образование зон связывания облегчается при высокой концентрации сахара (около 65%, но не менее 55%), который конкурирует с молекулами пектина в связывании молекул воды, тем самым уменьшая степень гидратации полимерных молекул пектина и позволяя им взаимодействовать.

Низкометоксилированные растворы пектина образуют гель лишь в присутствии дивалентных катионов, образующих мостики. Увеличение концентрации дивалентных катионов (в пищевой промышленности используются только ионы кальция) повышает температуру гелеобразования, а также прочность геля. Для описания процесса гелеобразования в растворах низкометоксилированных пектинов (как обычных, так и амидированных) обычно используют ту же модель структуры формованных лотков для яиц из бумажной массы, что и для гелей альгината кальция (см. раздел 3.3.11). Поскольку для желирования низкометоксилированных пектинов не нужен сахар, их используют в производстве желе, джемов и мармелада с пониженным содержанием сахара.

3.3.13. Гелановая камедь

Геллан, который в промышленности называют гелановой камедью (см. табл. 3.5) представляет собой внеклеточный анионный полисахарид, продуцируемый бактериями *Sphingomonas elodea*. Молекула геллана линейна и состоит из мономеров β-*D*-глюкопиранозила, β-*D*-глюкуронопиранозила и α-*L*-рамнопиранозила в молярном отношении 2 1 1. В нативном геллане (называемом также высокоацилированным) присутствуют две эфирные группы (ацетильная и глицериновая), расположенные на одном глюкозильном звене. В среднем одна глицериновая эфирная группа приходится на одно повторяющееся звено тетрасахарида, а одна ацетатная эфирная группа — на каждые два повторяющихся звена.

Некоторые гелланы деэтерифицируют щелочной обработкой. Удаление ацетильной группы оказывает существенное влияние на гелеобразующие свойства геллана. Деэтерифицированную форму называют низкоацилированным гелланом, у которого повторяющиеся звенья тетрасахарида имеет структуру →4)-βLRha*p*-(→3)-βGlc*p*-(1→4)-βGlc*p*A-(1→4)-βGlc*p*-(1→. Гелановая камедь поставляется в трех основных видах — как высокоацилированная (натуральная), низкоацилированная очищенная и низкоацилированная неочищенная. В пищевой промышленности применяется в основном низкоацилированная очищенная гелановая камедь. Смешивание высоко- и низкоацилированной гелановой камеди позволяет получать продукт с промежуточными свойствами.

Геллан образует гели как с одновалентными, так и с двухвалентыми катионами, при этом двухвалентные катионы (Ca^{2+}) оказываются примерно в 10 раз эффективнее. Гели образуются начиная с концентрации камеди 0,05% (то есть 99,95% воды). На процесс гелеобразования влияет охлаждение горячих растворов с требуемым катионом. Сдвиг в процессе охлаждения раствора геллана затрудняет обычный механизм гелеобразования, и в результате образуется гомогенная и тиксотропная жидкость (текучий гель), очень эффективно стабилизирующая эмульсии и суспензии. Слабое перемешивание геллановой геля разрушает структуру геля и превращает его в однородную текучую тиксотропную жидкость, отлично стабилизирующую эмульсии и суспензии.

Низкоацилированные виды гелановой камеди дают жесткие, хрупкие неэластичные гели (с текстурой, подобной агаровому гелю или гелю из каппа-каррагинана). Высокоацилированные (нативные) гелановые камеди дают мягкие, эластичные и нехрупкие гели (их текстура напоминает текстуру гелей из смеси ксантановой камеди и КРД). Промежуточные типы текстуры можно получить путем смешивания этих двух видов гелановых камедей.

При использовании геллановой камеди в качестве ингредиента хлебопекарных смесей она ни существенно не гидратируется при комнатной температуре, ни увеличивает вязкость жидкого теста. Вместе с тем при нагревании в готовом продукте удерживается и сохраняется влага. В рецептуры питательных батончиков геллановую камедь включают благодаря ее влагоудерживающим свойствам. Способность ее растворов образовывать взвеси при низких концентрациях без повышения вязкости используется в приготовлении диетических безалкогольных напитков [44].

3.3.14. Курдлан

Курдлан (Е424), полисахарид, продуцируемый *Agrobacterium biovar* (см. табл. 3.5), представляет собой 1,3-связанный глюкан, уникальным свойством которого является способность к гелеобразованию при нагревании его растворов. Курдлан дает два типа гелей, различающиеся по термообратимости. Термически обратимый гель получают при нагревании растворов курдлана примерно до 65 °С с последующим охлаждением до 60 °С. Нагревание растворов курдлана примерно до 80 °С позволяет получить прочный, термически необратимый гель, то есть гель, который после охлаждения не разрушается. По мере повышения температуры примерно до 130 °С прочность геля продолжает возрастать [37].

3.3.15. Гуммиарабик

При повреждениях коры некоторых деревьев и кустарников растения выделяют липкий материал, который при затвердевании герметизирует рану, защищая ее от проникновения инфекции и потери влаги. Такие выделения (экссудаты) встречаются у растений, произрастающих в полупустынных засушливых регионах. Из-за клейкости свежевыделенного экссудата (иногда его называют «слезами») к нему прилипают пыль, насекомые, бактерии и/или кусочки коры. Гуммиарабик (аравийская или сенегальская камедь), камедь карайи, камедь гхатти — все это экссудаты деревьев, а трагакантовая камедь — это эксудат кустарника. Из всех камедей пищевой камедью в настоящее время является только гуммиарабик [21, 63].

Он представляет собой экссудат разных видов акации, распространенных в тропических и субтропических регионах (см. табл. 3.5). К важнейшим регионам произрастания видов, дающих камедь наилучшего качества, относятся Судан и Нигерия. Обычно используют очищенные формы гуммиарабика, подвергнутые распылительной сушке.

Гуммиарабик — это гетерогенный материал, обычно включающий две основные фракции. Одна из них, на долю которой приходится около 70% камеди, состоит из молекул полисахарида с небольшим количеством белка или без него. В другой фракции присутствуют молекулы с большей молекулярной массой, включающие белок как неотъемлемую части их структуры. Эта белково-полисахаридная фракция сама по себе гетерогенна по содержанию белка. Полисахаридные структуры ковалентно химически связаны с белковым компонентом, являющимся преимущественно фрагментами гидропролина или, возможно, серина (двумя доминирующими аминокислотами этого полипептида). Общее содержание белка составляет около 2 %масс., но в отдельных фракциях белка может быть до 25 %масс.

Полисахаридные структуры (и связанные с белком, и не связанные) представляют собой сильноразветвленные кислотные арабиногалактаны примерно со следующим составом:

D-галактоза	44%;
L-арабиноза	24%;
D-глюкуроновая кислота	4,5%;
L-рамноза	13%;
4-О-метил-*D*-глюкуроновая кислота	1,5%.

Основные цепи этих полисахаридов состоят из (1→3)-связанных β-*D*-галактопиранозильных звеньев, имеющих от двух до четырех боковых ответвлений, состоящих из (1→3)-связанных β-*D*-галактопиранозильных звеньев, соединенных с основной цепью по (1→6)-связям. И к основной цепи, и к многочисленным боковым ответвлениям прикреплены звенья α-*L*-арабинофуранозила, α-*L*-рамнопиранозила, β-*D*-глюкуронопиранозила и 4-О-метил-β-*D*-глюкуронопиранозила. Звенья уроновой кислоты чаще встречаются в виде нередуцирующих концевых групп.

Гуммиарабик легко растворяется в воде при перемешивании. Среди всех пищевых камедей (кроме специально деполимеризованных в целях уменьшения вязкости) он обладает уникальным свойством высокой

растворимости и малой вязкости получаемых растворов. Можно приготовить растворы гуммиарабика до 50%-ной его концентрации (при более высокой концентрации дисперсии становятся гелеподобными).

Гуммиарабик — это хороший эмульгатор и стабилизатор вкусоароматических эмульсий типа «масло-в-воде». Его применяют для эмульгирования цитрусовых и других эфирных масел, а также ароматизаторов, применяемых в виде концентратов в производстве безалкагольных напитков и кондитерских изделий. В США индустрией безалкагольных напитков потребляется около 30% поставляемого гуммиарабика в виде эмульгатора и стабилизатора. Для стабилизации эмульсий он должен иметь «якорные» группы с сильным сродством к поверхности жира и такой размер молекул, который был бы достаточным для обволакивания поверхности его диспергированных капель. Гуммиарабик обладает необходимой поверхностной активностью и образует вокруг глобул жира толстые, стерически стабилизированные макромолекулярные слои. Эмульсии, приготовленные с использованием ароматических масел и гуммиарабика, можно подвергать распылительной сушке для производства порошковых ароматизаторов. Такие сухие ароматизаторы негигроскопичны, а вкусоароматические соединения в них защищены от окисления и испарения. Их характерным свойством является высокая скорость диспергирования и высвобождения вкусоароматических веществ без влияния на вязкость готового продукта. Такие стабильные сухие ароматизхаторы применяют в производстве сухих концентратов напитков, кексов, десертов, пудингов и суповых смесей.

Еще одним важным свойством гуммиарабика является его совместимость с высокими концентрациями сахара, благодаря чему его широко применяют в производстве кондитерских изделий с высоким содержанием сахара и малым содержанием влаги. Более половины производимого в мире гуммиарабика используется в производстве карамели, ириса, жевательных конфет и пастилы. В кондитерских изделиях он предотвращает кристаллизацию сахарозы, эмульгирует и распределяет жировые компоненты и ингибирует жировое поседение (образование белого налета на поверхности жиросодержащих продуктов вследствие изменения полиморфных форм жиров). Кроме того, гуммиарабик используют в качестве компонента глазурей или дражированных изделий.

3.3.16. Инулин и фруктоолигосахариды

Инулин (см. табл. 3.5) присутствует в качестве резервного углевода в тысячах видов растений, включая репчатый лук, чеснок, спаржу и бананы. Основной его промышленный источник — корень цикория (*Chicorium intybus*), а также клубни артишока (топинамбура) *Helianthus tuberosus L.*

Инулин состоит из β-*D*-фруктофуранозильных звеньев, связанных по связи 2→1. Полимерные цепи зачастую, но не всегда (из-за естественного расщепления и расщепления в ходе выделения) имеют на редуцирующем конце звено сахарозы. Степень полимеризации инулина редко превышает 60. В растениях инулин присутствует вместе с фруктоолигосахаридами — общая степень полимеризации составляет от 2 до 60.

Молекулы с фуранозильными звеньями (в частности, инулина и сахарозы) подвергаются кислотно катализируемому гидролизу намного легче, чем молекулы с пиранозильными звеньями. Инулин представляет собой резервный полисахаридный углевод растений, и в любой момент времени в них присутствуют его молекулы на различных стадиях синтеза и, возможно, расщепления. Из-за этого препараты инулина представляют собой смеси фруктоолигосахаридов (ФОС) и небольших молекул полисахарида.

Зачастую инулин специально деполимеризуют до ФОС. И инулин, и полученные из него ФОС-продукты обладают пребиотическими свойствами (пребиотики — это неусвояемые пищевые ингредиенты, полезные для здоровья потребителей из-за селективной стимуляции роста и/или жизнедеятельности определенных видов кишечных бактерий; чаще всего пребиотики используют именно из-за их оздоровительных свойств).

Водные растворы инулина можно приготовить в любых концентрациях вплоть до 50%-ной. При охлаждении горячих растворов инулина с концентрацией более 25% образуются термообратимые гели. Гели инулина — зернистые, включающие (особенно после сдвига) твердые частицы, имеющие кремообразную жироподобную текстуру, благодаря чему инулин можно использовать в производстве продуктов с пониженным содержанием жира в качестве его имитатора жира. Он улучшает текстуру соусов и мороженого с пониженным содержанием жира, а также ощущение во рту. В качестве ингредиента инулин применяют в производстве питательных батончиков, соевых напитков и пирожков с овощной начинкой.

Ни инулин, ни ФОС не перевариваются в желудке и тонкой кишке и представляют собой компоненты пищевых волокон (см. раздел 3.4). Их гликемический индекс равен нулю, то есть они не повышают уровень глюкозы и инсулина в крови [15–17, 19, 55].

3.4. Пищевые волокна и перевариваемость углеводов

Углеводы всегда служили основным источником энергии для обмена веществ в организме человека и средством поддержания здоровья желудочно-кишечного тракта. Углеводы также являются основными наполнителями, образующими «тело» пищевых продуктов.

Пищевые волокна состоят из компонентов клеточных стенок растений, прежде всего целлюлозы, иных некрахмалистых полисахаридов и лигнина. Общей отличительной чертой этих полимеров является то, что они не перевариваются в желудочно-кишечном тракте (это основной критерий для их отнесения к пищевым волоконам). К пищевым волокнам относятся не только натуральные пищевые ингредиенты, но и камеди, вносимые для обеспечения технологических и функциональных свойств, рассматривавшихся в разделах 3.3.7–3.3.16. Кроме того, к пищевым волокнам относят и вещества неполимерной природы — главное, чтобы это вещество не всасывалось в тонкой кишке, и поэтому к ним относят и неперевариваемые олигосахариды (например, раффинозу и стахиозу, см. раздел 3.2.3).

Олиго- и полисахариды могут быть перевариваемыми (главным образом крахмалсодержащие продукты), частично перевариваемыми (инвертная амилоза, так называемый стойкий крахмал) и не перевариваемыми (как правило, все остальные полисахариды). Если при пищеварении происходит гидролиз до моносахаридов, то продукты гидролиза всасываются и катаболизируются (через стенку тонкой кишки всасываются только моносахариды, а при гидролизе полисахаридов в организме человека образуется лишь *D*-глюкоза, поскольку перевариваются только крахмалы). Те углеводы, которые не могут быть подвергнуты гидролизу до моносахаридов под воздействием человеческих энзимов в тонком кишечнике (все, кроме сахарозы, лактозы и производных, типа получаемого из крахмала мальтодекстрина) могут быть метаболизированы микроорганизмами в толстом кишечнике, превращаясь в низкомолекулярные кислоты, которые частично всасываются и катаболизируются, обеспечивая организм энергией. Следовательно, углеводы независимо от размера их молекул могут быть как калорийными или частично калорийными, так и некалорийными.

Наиболее широко распространенными наполнителями натуральных пищевых продуктов являются остатки растительных клеток, стойкие к ферментативному гидролизу в пищеварительном тракте. К таким материалам относятся целлюлоза, гемицеллюлозы, пектин и лигнин. Пищевые волокна являются важным компонентом здорового питания, поскольку они способствуют нормальной работе желудочно-кишечного тракта, увеличивают объем кишечной и фекальной масс, сокращая время их прохождения через кишечник и предотвращая запоры. Присутствие этих волокон в пище дает чувство насыщения (сытости). Диетологи рекомендуют потреблять пищевые волокна в количестве 25–50 г/сут. Считается, что эти нерастворимые волокна понижают уровень холестерина в крови, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний и рака толстой кишки (возможно, благодаря очищающему действию пищевых волокон).

Растворимые камеди обладают сходным воздействием на желудочно-кишечный тракт и уровень холестерина в крови, но степень такого воздействия иная. Некоторые камеди (пектин, гуаровая и ксантановая камеди, гемицеллюлозы) специально изучались в этом отношении — например, гуаровая камедь при потреблении 5 г/сут дает снижение гликемического отклика, 13%-ное понижение уровня холестерина в сыворотке крови без снижения содержания липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Хорошим источником пищевых волокон помимо зерновых отрубей являются бобовые культуры, в частности фасоль. Продукт из оболочек семян подорожника блошного обладает высокой влагосвязывающей способностью, обусловливающей его ускоренное прохождение по желудочно-кишечному тракту, благодаря чему его применяют для предотвращения запоров (в тех же целях используют и продукт на основе МКУ).

Единственными полисахаридами, гидролизуемыми ферментами ЖКТ человека, являются полисахариды крахмала. Из них, естественно, образуется *D*-глюкоза, всасываемая через микроворсинки тонкой кишки и обеспечивающая человека энергией для обмена веществ. Другие же полисахариды, потребляемые обычно с овощами, фруктами и других продуктами растительного происхождения, а также с пищевыми

камедями, не перевариваются в желудке и тонкой кишке. Они поступают в толстую кишку, не претерпев существенных изменений (из-за недостаточно сильной кислотности в желудке или из-за недостаточно длительного их пребывания в нем для химического расщепления). Когда непереваренные полисахариды попадают в толстую кишку, они подвергаются действию кишечной микробиоты, некоторые представители которой продуцируют ферменты, катализирующие гидролиз определенных полисахаридов или определенных частей их молекул. В результате полисахариды, не расщепленные в верхней части ЖКТ, разлагаются и утилизируются бактериями толстой кишки.

Сахара, образованные при расщеплении молекул полисахаридов на отдельные части, служат для микроорганизмов толстой кишки источником энергии в метаболитических процессах анаэробного брожения с образованием молочной, пропионовой, масляной и валериановой кислот. Эти низкомолекулярные кислоты всасываются через стенку толстой кишки и метаболизируются (в основном в печени). Кроме того, некоторая часть (иногда значительная) расщепленных сахаров может всасываться через кишечную стенку и поступать в кровоток воротной вены, а оттуда в печень, где она метаболизируются. Считается, что в среднем 7% энергии в организм человека поступает от сахаров-продуктов расщепления полисахаридов микроорганизмами толстой кишки или от низкомолекулярных кислот, полученных из тех же полисахаридов путем анаэробного брожения. Степень разложения полисахаридов зависит от численности специфических микроорганизмов, продуцирующих необходимые ферменты. Например, при изменении типа потребляемого полисахарида его утилизация микроорганизмами толстой кишки может временно снижаться до тех пор, пока не размножатся те микроорганизмы, которые способны расщеплять новый полисахарид.

Некоторые полисахариды в процессе прохождения через ЖКТ остаются практически неизменными. Эти полисахариды вместе с крупными сегментами других полисахаридов увеличивают объем содержимого кишечника и сокращают время прохождения через него кишечных масс. Их положительный вклад в здоровье человека обусловлен снижением уровня холестерина в крови (возможно, за счет выведения солей желчных кислот и снижения риска их повторного всасывания из кишечника). Кроме того, присутствие больших количеств гидрофильных молекул способствует поддержанию достаточного количества воды в кишечнике с соответствующим размягчением кишечных масс, и, как следствие, облегчению их прохождения через толстую кишку.

Одним из натуральных компонентов пищевых волокон является водорастворимый полисахарид β-глюкан, присутствующий в овсяных и ячменных отрубях. β-Глюкан овса стал промышленно выпускаемым пищевым ингредиентом благодаря его эффективности в снижении уровня холестерина в сыворотке крови. Молекула β-глюкана овса представляет собой линейную цепь из β-*D*-глюкопиранозильных звеньев, около 70% которых связаны по связи (1→4), а 30% — по связи (1→3). Связи (1→3) отделены друг от друга последовательностями из двух-трех (1→4) связей. Таким образом, молекула β-глюкана состоит из (1→3)-связанных звеньев β-целлотриозил[→3)-βGlc*p*-(1→4)- βGlc*p*-(1→4)-βGlc*p*-(1→] и β-целлотриозила (рис. 3.55). Такие (1→4,1→3)- β-глюканы зачастую называют β-глюканами со смешанными связями.

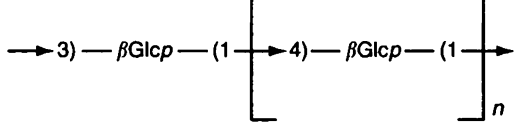


Рис. 3.55. Примерная упрощенная структура звена β-глюканов овса и ячменя, где *n*, как правило, равно 1 или 2, но иногда и больше

При употреблении с пищей β-глюканы снижают уровень глюкозы в сыворотке крови после еды и инсулиновый отклик; тем самым регулируется гликемический отклик как у здоровых людей, так и у больных диабетом. Данный эффект, по-видимому, коррелирует с вязкостью. Кроме того, β-глюканы уменьшают содержание холестерина в сыворотке крови у подопытных крыс и цыплят, а также у людей (эти физиологические эффекты типичны для растворимых пищевых волокон — другие растворимые полисахариды обладают сходным действием, но в иной степени) [2, 8, 9, 15, 16, 31, 35, 41, 53, 60, 62, 64, 67].

Дополнительная литература

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (eds). *Food Chemistry.* — Ch. 4, 19. — Berlin: Springer-Verlag, 2004.

BeMiller J. N. Carbohydrate analysis // *Food Analysis* / S. S. Nielsen (ed.). — 3rd ed. — Ch. 10. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publ., 2003.

BeMiller J. N. *Whistler and BeMiller's Carbohydrate Chemistry for Food Scientists.* — 2nd ed. — St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 2005.

Eliason A.-C. (ed). *Carbohydrates in Food.* — NY: Marcel Dekker, 1996.

Nomenclature of Carbohydrates // *Pure and Applied Chemistry,* 1996, 68, p. 1919-2008; *Carbohydrate Research,* 1997, 297, p. 1–92; *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* 1997, 52, p. 43–177. См также: http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/2carb/ (Номенклатура, приведенная в указанных источниках, идентична).

Tomasik P. (ed). *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides.* — Boca Raton: CRC Press, 2004.

Использованная литература

1. Aguilera J. M., L. Cadoche L., Lopez C., Guitierrez G. Microstructural changes of potato cells and starch granules heated in oil // *Food Research Intern.,* 2001, 34, p. 939–941.
2. Autio K. Functional aspects of cereal cell wall polysaccharides // *Carbohydrates in Food* / A.-C. Eliasson (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1996. — P. 227–264.
3. Becalski A., Lau B. P.-Y., Lewis D., Seaman S. W. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 2003, 57, p. 802–808.
4. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (eds). *Food Chemistry.* — Ch. 4. — Berlin: Springer-Verlag, 2004.
5. BeMiller J. N. Starch-based gums // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 579–600.
6. Biliaderis C. G. Thermal analysis of food carbohydrates // *Thermal Analysis of Foods* / V. R. Harwalkar, C.-Y. Ma (eds). — NY: Elsevier Science, 1990. — P. 168–220.
7. Biliaderis C. G. The structure and interactions of starch with food constituents // *Can. J. of Physiology and Pharmacology,* 1991, 69, p. 60–78.
8. Cho S. S., Prosky L., Dreher M. (eds). *Complex Carbohydrates in Foods.* — NY: Marcel Dekker, 1999.
9. Cho S. S., Dreher M. L. (eds). *Handbook of Dietary Fiber.* — NY: Marcel Dekker, 2001.
10. Christensen S. H. Pectins // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol III. — Boca Raton: CRC Press, 1984. — P. 205–230.
11. Clare K. Algin // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 105–143.
12. Dea I. C. M. Conformation origins of polysaccharide solution and gel properties // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 21–52.
13. Dickinson E. (ed.). *Food Polymers, Gels, andColloids.* — London: The Royal Society of Chemistry, 1991.
14. Feddersen R. L. Thorp S. N. Sodium carboxymethylcellulose // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 537–578.
15. Flamm G., Glinsman W., Kritchevsky D., Prosky L., Roberfroid M. Inulin and oligo-fructose as dietary fiber: a review of the evidence // *Crit. Rev. in Food Science and Nutrition,* 2001, 43, p. 353–362.
16. Flickinger E. A., Loo J. V., Fahey G. C., Jr. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review // *Crit. Rev.in Food Science and Nutrition,* 2003, 43, p. 19–60.
17. Franck A., De Leenheer L. Inulin // *Biopolymers* / E. J. Vandamme, S. De Baets, A. Steinbiichel (eds). — Vol. VI (Polysaccharides from Eukaryotes). — Weinheim: Wiley-VCH, 2002. — P. 439–479.
18. Freidman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide: a review // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 2003, 57, p. 4504–4526.
19. Fuchs A. (ed.). *Inulin and Inulin-containing Crops.* — Amsterdam: Elsevier, 1993.
20. Glicksman M. Functional properties of hydrocolloids // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. I. — Boca Raton: CRC Press, 1982. — P. 47–99.
21. Glicksman M.. Gum arabic (gum acacia) // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. II. — Boca Raton: CRC Press, 1983. — P. 7–29.
22. Glicksman M. Red seaweed extracts (agar, carrageenan, furcellaran) // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. II. — Boca Raton: CRC Press, 1983. — P. 73–113.
23. Gray J. A., BeMiller J. N. Bread staling: molecular basis and control // *Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety,* 2003, 2, p. 1–21.
24. Grover J. A. Methylcellulose (MC) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. III. — Boca Raton: CRC Press, 1984. — P. 121–154.
25. Grover J. A. Methylcellulose and its derivatives // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 475–504.

26. Harris P. (ed.). *Food Gels.* — London: Elsevier Applied Science, 1990.
27. Herald C. T. Locust/carob bean gum // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. III. — Boca Raton: CRC Press, 1984. — P. 161–170.
28. Herald C. T. Guar gum // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. III. — Boca Raton: CRC Press, 1984. — P. 171–184.
29. Jarvis M. C. Intercellular separation forces generated by intracellular pressure // *Plant Cell and Environment,* 1998, 21, p. 1307–1310.
30. Jarvis M. C, MacKenzie E., Duncan H. J. The textural analysis of cooked potato. 2. Swelling pressure of starch during gelatinization // *Potato Research,* 1992, 35, p. 93–102.
31. Johnson I. T., Southgate D. A. T. *Dietary Fibre and Related Substances.* — London: Chapman & Hall, 1994.
32. Kang K. S., Pettitt D. J. Xanthan, gellan, welan, and rhamsan // *Industrial Gums* /R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 341–397.
33. Keller J. D. Sodium carboxymethylcellulose (CMC) // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. III. — Boca Raton: CRC Press, 1984. — P. 43–109.
34. King A. H. Brown seaweed extracts (alginates) // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. II. — Boca Raton: CRC Press, 1983. — P. 115–188.
35. Kritchevsky D., Bonfield C. (eds). *Dietary Fiber in Health and Disease.* — St. Paul: Eagan Press, 1995.
36. Labuza T. P, Reineccius G. A., Monnier V., O'Brien J., Baynes J. (eds). *Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health.* — Boca Raton: CRC Press, 1995.
37. Lee I.-Y. Curdlan // *Biopolymers* / E. J. Van-damme, De Baets S. Steinbiichel A. (eds.). — Vol. V (Polysaccharides from Prokaryotes). — Weinheim: Wiley-VCH, 2002. — P. 135–158.
38. Maier H., Anderson M., Karl C., Magnuson K., Whistler R. L. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). —San Diego: Academic Press, 1993. — P. 181–226.
39. Manners D. J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure // *Carbohydrate Polymers,* 1989, 77, p. 87–112.
40. Mathlouthi M., Reiser P. (eds). *Sucrose: Properties and Applications.* — Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995.
41. McCleary B. V., Prosky L. (eds). *Advanced Dietary Fibre Technology.* — London: Blackwell Science, 2001.
42. Miles M. J., Morris V. J., Orford P. D., Ring S. G. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch // *Carbohydrate Research,* 1985, 755, p. 271–281.
43. Morris V. J. Starch gelation and retrogradation // *Trends in Food Science and Technology,* 1994, 1, p. 2–6.
44. Morris V. J. Bacterial polysaccharides // *Food Polysaccharides and Their Applications* / A. M. Stephen (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1995. — P. 341–375.
45. Ormerod A., Ralfs J., Jobling S., Gidley M. The influence of starch swelling on the material properties of cooked potatoes // *J. of Materials Science,* 2002, 37, p. 1667–1673.
46. Pennington N. L., Baker C. W. (eds). *Sugar, A User's Guide to Sucrose.* — NY: Van Nostrand Reinhold, 1990.
47. Pettitt D. Xanthan gum // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. I. — Boca Raton: CRC Press, 1982. — P. 127–149.
48. Qi Z. H., Romberger M. L. Cyclodextrins // *Polysaccharide Association Structures in Food* / R. H. Walter (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1998. — P. 207–225.
49. Rolin C. Pectin // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 257–293.
50. Rydberg P., Eriksson S., Tareke E., Karlson P., Ehrenberg L., Tornqvist M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 2003, 57, p. 7012–7018.
51. Schenck F. W., Hebeda R. E. (eds). *Starch Hydrolysis Products.* — NY: VCH Publishers, 1992.
52. Slade L., Levine H. A food polymer science approach to selected aspects of starch gelatinization and retrogradation // *Frontiers in Carbohydrate Research–1* / R. P. Millane, J. N. BeMiller, R. Chandrasekaran (eds.). — Elsevier Applied Science, 1989. — P. 215–270.
53. Spiller G. A. *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition.* — 2nd ed. — Boca Raton: CRC Press, 1993.
54. Stephen A. M. (ed.). *Food Polysaccharides and Their Applications.* — NY: Marcel Dekker, 1995.
55. Suzuki M., Chatterton N. J. *Science and Technology of Fructans.* — Boca Raton: CRC Press, 1993.
56. Szente L., Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients // *Trends in Food Science and Technology,* 2004, 75, p. 137–142.
57. Therkelsen G. H. Carrageenan // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 145–180.
58. Thomas W. R. Microcrystalline cellulose (MCC or cellulose gel) // *Food Hydrocolloids* / M. Glicksman (ed.). — Vol. III. — Boca Raton: CRC Press, 1984. —P. 9–42.
59. Tomasik P., Palasinski M. Wiejak S. The thermal decomposition of carbohydrates. Part 1. The decomposition of mono-, di-, and oligo-saccharides // *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* 1989, 47, p. 203–278.
60. Tungland B. C., Meyer D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 2002, 7, p. 73–92.

61. Van Beynum G. M. A., Roels J. A. (eds). *Starch Conversion Technology.* — NY: Marcel Dekker, 1985.
62. Van der Kamp J. W., Asp N.-G., Jones J. M., Schaafsma G. (eds). *Dietary Fibre: Bio-active Carbohydrates for Food and Feed.* — Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2004.
63. Whistler R. L. Exudate gums // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 309–339.
64. Whistler R. L. Hemicelluloses // *Industrial Gums* / R. L. Whistler, J. N. BeMiller (eds). — San Diego: Academic Press, 1993. — P. 295–308.
65. Whistler R. L., BeMiller J. N. (eds). *Industrial Gums.* — 3rd ed. — San Diego: Academic Press, 1993.
66. Whistler R. L., BeMiller J. N., Paschall E. F. (eds). *Starch: Chemistry and Technology.* — 2nd ed. — NY: Academic Press, 1984.
67. Wood P. J. (ed.). *Oat Bran.* — St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1993.
68. Wurzburg O. B. (ed.). *Modified Starches: Properties and Uses.* — Boca Raton: CRC Press, 1986.
69. Yaylayan V. A., Huyghues-Despointes A. Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 1994, 34, p. 321–369.
70. Yaylayan V. A., Wnorowski A., Perez Locas C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 2003, 51, p. 1753–1757.
71. Young R. A., Rowell R. M. (eds). *Cellulose.* — NY: John Wiley & Sons, 1986.
72. Zobel H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review // *Starch/Staerke,* 1988, 40, p. 44–50.
73. Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M. et al. Acrylamide formation mechanisms in heated foods // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 2003, 57, p. 4782–4787.

4. ЖИРЫ

Д. Джулиан Мак-Клементс (*D. Julian McClements*), Эрик А. Деккер (*Eric A. Decker*)
Перевод Н. С. Селивановой под науч. ред. канд. биол. наук С. Н. Кулаковой

Содержание

4.1. Введение. . 155
4.2. Основные компоненты липидов 156
4.2.1. Жирные кислоты 156
4.2.1.1. Номенклатура насыщенных жирных кислот 156
4.2.1.2. Номенклатура ненасыщенных жирных кислот. . . 156
4.2.2. Ацилглицерины 158
4.2.2.1. Состав жиров. 159
4.2.3. Фосфолипиды. 161
4.2.4. Сфинголипиды 162
4.2.5. Стерины 162
4.2.6. Воски 162
4.2.7. Прочие жиры 163
4.3. Физико-химические свойства липидов 163
4.3.1. Физические свойства триацилглицеринов 164
4.3.1.1. Реологические свойства 164
4.3.1.2 Плотность 165
4.3.2. Кристаллизация и плавление пищевых жиров . . . 167
4.3.3. Физико-химические основы фазовых изменений жиров 168
4.3.3.1. Переохлаждение 169
4.3.3.2. Нуклеация 170
4.3.3.3. Рост кристаллов 171
4.3.3.4. Посткристаллизационные процессы . 172
4.3.4. Кристаллическая структура . . . 172
4.3.4.1. Морфология кристаллов 172
4.3.4.2. Полиморфизм . 173
4.4. Переработка жиров. Выделение, очистка и модификация . . . 174
4.4.1. Рафинирование 174
4.4.1.1. Дегуммирование 175
4.4.1.2. Нейтрализация 175
4.4.1.3. Отбеливание 175
4.4.1.4. Дезодорирование 175
4.4.2. Изменение состава твердых триглицеридов в пищевых жирах 175
4.4.2.1. Смешивание 176
4.4.2.2. Изменение состава кормов для животных 176
4.4.2.3. Генетические методы . 176
4.4.2.4. Фракционирование 176
4.4.2.5. Гидрогенизация. . 176
4.4.2.6. Переэтерификация. 178
4.5. Роль триацилглицеринов в пищевых продуктах 179
4.5.1. Текстура . . . 179
4.5.2. Внешний вид. 181
4.5.3. Вкус и аромат 181

4.6. Химическое разложение жиров. Гидролитические реакции... 182
4.7. Химическая порча жиров. Окислительные реакции 182
4.7.1. Механизмы окисления липидов 182
4.7.2. Прооксиданты 185
4.7.2.1. Стимулирование образования гидропероксидов 186
4.7.2.2. Стимулирование образования свободных радикалов 189
4.7.2.3. Стимулирование разложения гидропероксидов... 189
4.7.3. Образование продуктов окислительного разложения липидов 190
4.7.3.1. Реакции β-расщепления 191
4.7.3.2. Дополнительные реакции продуктов разложения жирных кислот 193
4.7.3.3. Окисление холестерина 193
4.7.4. Антиоксиданты 193
4.7.4.1. Контроль образования свободных радикалов 193
4.7.4.2. Контроль прооксидантов 198
4.7.4.3. Контроль промежуточных продуктов окисления 199
4.7.4.4. Взаимодействия между антиоксидантами 199
4.7.4.5. Локализация антиоксидантов 200
4.7.5. Прочие факторы, влияющие на скорость окисления липидов 200
4.7.6. Способы измерения степени окисления липидов 201
4.7.6.1. Органолептический анализ 201
4.7.6.2. Первичные продукты окисления 201
4.7.6.3. Вторичные продукты окисления 202
4.8. Пищевые жиры и их влияние на здоровье человека. 204
4.8.1. Биологическая активность жирных кислот 204
4.8.1.1. *Транс*-изомеры жирных кислот 204
4.8.1.2. Омега-3 жирные кислоты 204
4.8.1.3. Конъюгированная линолевая кислота 205
4.8.1.4. Фитостерины. 205
4.8.1.5. Каротиноиды. 206
4.8.2. Низкокалорийные жиры 206
4.9. Краткое резюме. 206
Литература 207

4.1. Введение

Жиры (липиды) — эта большая группа химически разнообразных соединений, хорошо растворимых в органических растворителях. Пищевые липиды в основном называют жирами (в твердом виде) и маслами (в жидком виде), тем самым указывая на их физическое состояние при комнатной температуре. Пищевые липиды также подразделяют на неполярные (например, триацилглицерины и холестерин) и полярные (например, фосфолипиды), указывая тем самым на различия в их растворимости и функциональных свойствах. Полярные липиды зачастую имеют гидрофильную «голову», характеризующуюся высоким сродством к воде, и липофильный «хвост» с высоким сродством к жирам [1]. Такая поверхностная активность липидов может менять свойства пищевых продуктов путем различных физико-химических механизмов — поверхностной абсорбции, стабилизации частиц, взаимодействия с биополимерами и изменения зародышей (центров) кристаллизации, роста кристаллов жира и их структуры [1–5] (подробнее об этом см. главу 13).

Общее содержание жиров и липидный состав пищи сильно варьируют. Поскольку пищевые жиры играют большую роль в качестве пищевых продуктов, оказывая влияние на такие их свойства, как текстура, вкус и аромат, нутритивные свойства и энергетическую ценность, манипуляции с этими важными ком-

понентами пищевых продуктов в течение нескольких последних десятилетий были одним из важнейших направлений разработки пищевых продуктов. Подобные разработки были направлены на изменение жирового состава в целях изменения текстуры, жирнокислотного состава и содержания холестерина, снижения общего содержания жиров, усвояемости и стойкости жиров к окислению. Кроме того, для качества пищевых продуктов важен такой параметр, как физическая стабильность липидов, поскольку многие из них существуют в виде термодинамически нестабильных дисперсий или эмульсий. Для изменения жирового состава, необходимого для производства высококачественных продуктов, необходимо знать и понимать фундаментальные физические и химические свойства липидов. В этой главе будут рассмотрены химический состав липидов, их физические свойства и процессы кристаллизации, методы модификации жирных кислот и триацилглицеринов, и, следовательно, физико-химические свойства жиров, их способность расщепляться под действием окислителей, а также будет дана оценка значения жиров для здорового и больного человека. Методы анализа пищевых жиров рассмотрены во многих работах (см., в частности, работы [6, 7]).

4.2. Основные компоненты липидов

В этом разделе мы вкратце рассмотрим номенклатуру основных классов пищевых жиров. Подробнее она рассмотрена в работе [8] и приведлена на сайте *IUPAC — http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid.*

4.2.1. Жирные кислоты

Основными компонентами липидов являются жирные кислоты — соединения, состоящие из алифатической цепочки с концевой карбоксильной кислотной группой. Большинство натуральных жирных кислот имеет четное число атомов углерода в основной цепи вследствие биологических процессов удлинения жирной кислоты, сопровождающихся добавлением двух атомов углерода. Исключения составляют жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода и разветвленной цепочкой, обнаруженные в таких источниках, как микроорганизмы и молочные жиры. Основная часть натуральных жирных кислот состоит из цепочки в 14–24 атомов углерода. В то же время некоторые жирные кислоты содержат менее 14 атомов углерода (большая часть этих низкомолекулярных жирных кислот обнаружена в тропических маслах и молочном жире). Жирные кислоты также классифицируют как насыщенные и ненасыщенные (содержащие двойные связи). Жирные кислоты могут быть поименованы по систематической, обычной или сокращенной номенклатуре.

4.2.1.1. Номенклатура насыщенных жирных кислот

По номенклатуре *IUPAC* систематические описания жирных кислот нормализованы по наименованию исходных углеводородов жирных кислот на базе количества атомов углерода (например, жирная кислота с десятью атомами углерода называется декановой, см. табл. 4.1). Для большинства жирных кислот существуют тривиальные названия (у всех с четным количеством атомов углерода и у многих с нечетным). Многие такие тривиальные названия связывают кислоту с ее природным источником (например, пальмитиновую кислоту и пальмовое масло). Для сокращенных наименований существует определенная система нумерации, где первое число указывает на количество атомов углерода в жирной кислоте, а второе — на число двойных связей (например, гексадекановая кислота = пальмитиновая кислота = $C_{16:0}$). У насыщенных жирных кислот второе число — это всегда ноль.

4.2.1.2. Номенклатура ненасыщенных жирных кислот

Жирные кислоты с двойными связями в алифатической цепи называют ненасыщенными жирными кислотами. В системе *IUPAC* для обозначения наличия двойной связи используется суффикс -енов- (см. табл. 4.1). В зависимости от количества двойных связей добавляют приставки ди-, три-, тетра- и т. д., но помимо этого у ненасыщенных жирных кислот существуют и тривиальные названия (за исключением некоторых высокомолекулярных полиненасыщенных жирных кислот), и сокращенные обозначения, аналогичные обозначениям насыщенных жирных кислот (второе число указывает на число двойных

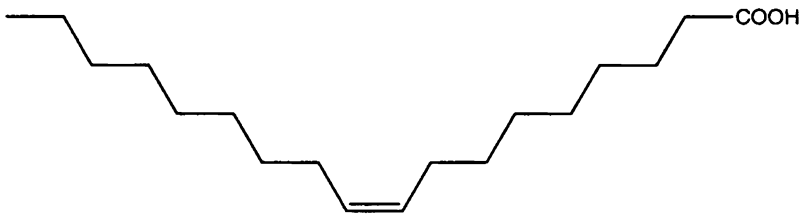
Таблица 4.1
Систематические, тривиальные и сокращенные обозначения пищевых жирных кислот

Систематическое наименование	Тривиальное название	Сокращенное обозначение
	Насыщенные кислоты:	
Гексановая	капроновая	$C_{6:0}$
Октановая	каприловая	$C_{8:0}$
Декановая	каприновая	$C_{10:0}$
Додекановая	лауриновая	$C_{12:0}$
Тетрадекановая	миристиновая	$C_{14:0}$
Гексадекановая	пальмитиновая	$C_{16:0}$
Октадекановая	стеариновая	$C_{18:0}$
	Ненасыщенные кислоты:	
цис-9-Октадеценовая	олеиновая	$C_{18:1}$ Δ9
цис-9, *цис*-12-Октадекадиеновая	ленолевая	$C_{18:2}$ Δ9
цис-9, *цис*-12, *цис*-15-Октадекатриеновая	леноленовая	$C_{18:3}$ Δ9
цис-5, *цис*-8, *цис*-11, *цис*-14-Эйкозатетраеновая	арахидоновая	$C_{20:4}$ Δ5
цис-5, *цис*-8, *цис*-11, *цис*-14, *цис*-17-Эйкозапентаеновая	*EPA*	$C_{20:5}$ Δ5
цис-4, *цис*-7, *цис*-10, *цис*-13, *цис*-16, *цис*-19-Докозагексаеновая	*DHA*	$C_{22:6}$ Δ4

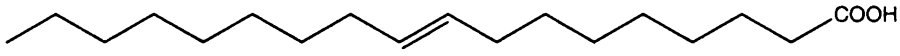
связей, например, октадекадиеновая кислота = $C_{18:2}$). Позиция двойной связи в системе *IUPAC* обозначается символом дельта (Δ) — это положение двойной связи, считая от карбоксильной группы жирной кислоты. Например, олеиновая кислота с 18-ю атомами углеродов и одной двойной связью называется 9-октадеценовой кислотой, а линолевая кислота с 18-ю атомами углерода и двумя двойными связями — 9,12-октадекадиеновой кислотой. В другой численной системе обозначений указывается позиция двойной связи по отношению к метильной группе жирной кислоты, и такую систему называют омега-(ω-) системой (иногда вместо греческой буквы «омега» используют латинскую букву *n*). ω-Система удобна в том смысле, что в ней жирные кислоты сгруппированы по их биологической активности и источнику биосинтеза, поскольку многие ферменты при этерификации с глицерином распознают жирные кислоты по свободному метильному концу. Например, ω-3 жирные кислоты зачастую обладают сходной биологической активностью, выражающейся в их способности снижать уровень триацилглицеринов в крови [9].

Природным жирным кислотам присуща *цис*-конфигурация двойной связи. В *цис*-конфигурации атомы углерода алифатической цепи находятся по одну сторону от двойной связи, тогда как в *транс*-конфигурации — по разные стороны (рис. 4.1). В полиненасыщенных жирных кислотах (более чем с двумя двойными связями) двойные связи в большинстве случаев разделены метиленовой группой. Такую конфигурацию зачастую называют пентадиеновой системой, в которой две двойные связи находятся при 1-м и 4-м атомах углерода. Другими словами, эти двойные связи не конъюгированы, а напротив, разорваны метиленовой группой (рис. 4.2). Это означает, что двойные связи в большинстве ненасыщенных жирных кислот находятся при трех отдельных атомах углерода (например, 9,12,15-октадекатриеновая кислота). Тем самым если известно положение первой двойной связи, то можно предсказать положение всех двойных связей в большинстве натуральных жирных кислот. Именно поэтому в сокращенном обозначении приводится иногда только число двойных связей и положение первой двойной связи (например, 9,12,15-октадекатриеновая кислота = $C_{18:3}$, Δ9 = $C_{18:3}$, ω-3).

Наличие двойной связи влияет на температуру плавления жирных кислот, а двойные связи в *цис*-конфигурации придают жирной кислоте изогнутую конфигурацию, то есть ненасыщенные жирные кислоты нелинейны, что затрудняет их ориентацию в компактной «упаковке». Из-за подобных стерических затруднений Ван-дер-Ваальсовые взаимодействия между ненасыщенными жирными кислотами слабее, что позволяет им сохранять жидкое состояние при комнатной температуре, и их температуры плавления и затвердевания относительно низки. По мере увеличения числа двойных связей молекула стано-

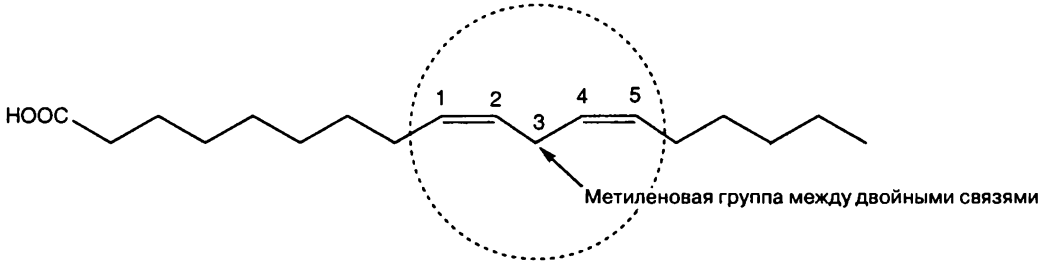


цис-9-октадеценовая кислота (олеиновая)



транс-9-октадеценовая кислота (элаидиновая)

Рис. 4.1. Различия в двойных связях *цис*- и *транс*- ненасыщенных жирных кислот



Пентадиеновая система обозначения линолевой кислоты

Рис. 4.2. Пентадиеновая система обозначения полиненасыщенных жирных кислот (на примере линолевой кислоты)

вится все более изогнутой, Ван-дер-Ваальсовые силы уменьшаются, и температура плавления снижается еще больше. Жирные кислоты с двойными связями в *транс*-конфигурации более линейны, чем в *цис*-конфигурации, что приводит к более компактной упаковке молекул и более высокой точке плавления. Например, примерная температура плавления стеариновой кислоты (октадекановой) составляет 70 °С, олеиновой (*цис*-9-октадеценовой) — 5 °С, а элаидиновой (*транс*-9-октадеценовой) — 44 °С [10].

4.2.2. Ацилглицерины

Более 99% жирных кислот растительного и животного сырья этерифицированы с глицерином. Свободные жирные кислоты в живых тканях не очень распространены из-за их цитотоксичности, то есть способности разрушать структуру клеточных мембран. Этерифицированные с глицерином жирные кислоты утрачивают поверхностную активность, а значит и цитотоксичность.

Существуют моно-, ди-, и триэфиры ацилглицеринов, называемые соответственно моно-, ди- и триацилглицеринами. Наиболее распространены в пищевых продуктах триацилглицерины (ТАГ), хотя моно- и диэфиры иногда используют в качестве пищевых добавок (например, как эмульгаторы). Если к глицерину присоединены три различные жирные кислоты, то хиральным является центральный атом углерода ТАГ. Из-за этого в ТАГ три атома углерода в молекуле глицерина дифференцируются по стереоспецифической нумерации *(sn)*. Если расположить ТАГ в фишеровской проекции, то три атома углерода сверху вниз обозначают 1, 2, 3.

Существует несколько номенклатур наименований триацилглицеринов. ТАГ зачастую обозначают по тривиальным названиям входящих в их состав жирных кислот — если ТАГ содержит одну жирную кислоту (например, стеариновую, сокращенно *St*), то он может быть назван тристеарином, тристеаратом, глицерин тристеаратом, тристеариновым глицерином, *StStSt* или $C_{18:0}$–$C_{18:0}$–$C_{18:0}$. ТАГ с разными жир-

ными кислотами называют по-разному в зависимости от стереоспецифичности каждой жирной кислоты (если она известна). В номенклатуре этих гетерогенных ТАГ суффикс -ов- заменяется на -оил-. Если стереоспецифичность гетерогенного ТАГ неизвестна, то триацилглицерин с пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислотами будет называться пальмитоил-олеоил-стеароил-глицерином. Иначе этот ТАГ может называться пальмито-олео-стеарином или глицерин-пальмито-олео-стеаратом. Если известна стереоспецифичность положений жирных кислот, то добавляются символы *sn*-, например, 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароил-*sn*-глицерин, *sn*-1-пальмито-2-олео-3-стеарин, или *sn*-глицерин-1-пальмито-2-олео-3-стеарат. Если две жирные кислоты в составе ТАГ одинаковые, то название может быть укорочено: 1,2-дипальмитоил-3-стеароил-*sn*-глицерин или *sn*-1,2-дипальмито-3-стеарат. Гетерогенные ТАГ можно сокращенно обозначать, например, *PStO* или $C_{16:0}$–$C_{18:0}$–$C_{18:1}$ для 1-пальмитоил-2-олеоил-3-стеароил-*sn*-глицерина (если стереоспецифичность неизвестна) или *sn*–*PStO* или *sn*–$C_{16:0}$–$C_{18:0}$–$C_{18:1}$ (если стереоспецифичность известна).

4.2.2.1. Состав жиров

В пищевых жирах содержатся самые разные жирные кислоты (табл. 4.2). Жирам свойственны некоторые общие тенденции. Большинство растительных жиров, особенно из семян масличных культур, являются ненасыщенными и содержат главным образом жирные кислоты с 18-ю атомами углерода. К маслам, богатым олеиновой кислотой, относятся оливковое и рапсовое (канола), к маслам, богатым линолевой кислотой, — соевое, кукурузное и подсолнечное, а масло с высоким содержанием линоленовой кислоты получают из семян льна. Триацилглицерины из растительного сырья с большим количеством насыщенных жирных кислот присутствуют в масле какао и маслах других тропических растений (в частности, в кокосовом масле). Кокосовое и пальмоядровое масла уникальны по содержанию большого количества жирных кислот со средней длиной молекулярной цепи (от $C_{8:0}$ до $C_{14:0}$), причем преобладают цепочки $C_{12:0}$. Содержание насыщенных жирных кислот в жирах и маслах животного происхождения возрастает в следующей последовательности: молочный жир > бараний жир > говяжий жир > свиной жир > куриный жир > жир индейки > рыбий жир. В них основными насыщенными кислотами являются стеариновая и пальмитиновая. Жирнокислотный состав животного сырья зависит от особенностей пищеварительной системы животных, причем состав жира нежвачных животных (например, птицы, свиней и рыбы) частично зависит от состава жиров в их кормах. Примером здесь может служить свинина для получения иберийской ветчины — в этом случае кормовые рационы специально подбираются для получения сала с высоким содержанием олеиновой кислоты. Среди нежвачных животных по-своему уникальны ТАГ обитателей морей из-за содержащегося в них большого количества ω-3 жирных кислот (эйкозапентаеновой и докозагексаеновой). У коров и овец потребляемые с кормами жирные кислоты подвергаются биопревращениям микробными ферментами в рубце с преобразованием ненасыщенных жирных кислот в насыщенные, что может привести к образованию конъюгированных двойных связей (например, в конъюгированной линолевой кислоте, КЛК). Поскольку жвачные животные потребляют в основном жиры из растительного корма, состоящие из 18 атомов углерода, то конечным продуктом такого биопревращения оказывается стеариновая кислота. Тем самым в сливочном масле, говяжьем и бараньем жире содержится больше стеариновой кислоты, чем в жире нежвачных животных. Бактерии из рубца жвачных уникальны тем, что они могут ферментировать углеводы до ацетата и β-гидроксибутирата. В молочных железах эти соединения преобразуются в жирные кислоты, и получаются жиры с высоким содержанием насыщенных низкомолекулярных жирных кислот ($C_{4:0}$ и $C_{6:0}$), которые не встречаются ни в каких других пищевых ТАГ. Бактерии из рубца жвачных также способствуют образованию кето-, гидрокси- и разветвленных жирных кислот. Из-за сильного влияния бактерий на жирные кислоты в сливочном масле присутствуют сотни различных жирных кислот.

В пищевых ТАГах изменяется и стереоспецифичность жирных кислот. В триацилглицеринах некоторых жиров (например, в говяжьем жире, оливковом и арахисовом маслах) большинство жирных кислот равномерно распределены по трем позициям молекулы глицерина. Вместе с тем некоторые жиры стереоспецифичны относительно позиции жирных кислот. Во многих ТАГ растительного происхождения полиненасыщенные жирные кислоты сосредоточены во второй (*sn*-2) позиции. Хорошим примером может служить масло какао, где 85% олеиновой кислоты находится в *sn*-2 позиции, а пальмитиновая и стеариновая кислоты равномерно распределены по *sn*-1 и *sn*-2 позициям. В некоторых животных жирах ТАГ

Таблица 4.2

Жирнокислотный состав (% масс. от общего содержания жирных кислот) некоторых распространенных продуктов (перечислены лишь основные жирные кислоты)

Пищевой продукт /жирная кислота	Жирная кислота														Массовая доля насыщенных жирных кислот	Полиморфная форма кристаллов жира
	$C_{4:0}$	$C_{6:0}$	$C_{8:0}$	$C_{10:0}$	$C_{12:0}$	$C_{14:0}$	$C_{16:0}$	$C_{16:1}\,\Delta9$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}\,\Delta9$	$C_{18:2}\,\Delta9$	$C_{18:3}\,\Delta9$	$C_{20:5}\,\Delta5$	$C_{22:6}\,\Delta4$		
Оливки							13,7	1,2	2,5	71,1	10,0	0,6			16,2	β
Рапс (канола)							3,9	0,2	1,9	64,1	18,7	9,2			5,5	β
Кукуруза							12,2	0,1	2,2	27,5	57,0	0,9			14,4	β
Соевые бобы						0,1	11,0	0,1	4,0	23,4	53,2	7,8			15,0	β
Семена льна							4,8		4,7	19,9	15,9	52,7			9,5	
Кокос		0,5	8,0	6,4	48,5	17,6	8,4		2,5	6,5	1,5				91,9	β'
Какао						0,1	25,8	0,3	34,5	35,3	2,9				60,4	β
Сливочное масло	3,8	2,3	1,1	2,0	3,1	11,7	26,2	1,9	12,5	28,2	2,9	0,5			62,7	β'
Говяжий жир				0,1	0,1	3,3	25,5	3,4	21,6	38,7	2,2	0,6			50,6	β'
Свиной жир				0,1	0,1	1,5	24,8	3,1	12,3	45,1	9,9	0,1			38,8	β
Куриный жир					0,2	1.3	23.2	6.5	6.4	41.6	18.9	1.3			31,1	
Атлантический лосось						5,0	15,9	6,3	2,5	21,4	1,1	0,6	1,9	11,9	23,4	β'
Куриные яйца						0,3	22,1	3,3	7,7	36,6	11,1	0,3			30,1	

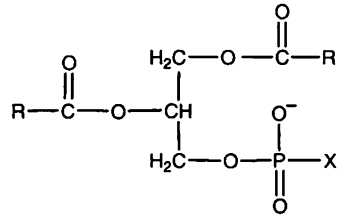
Примечание. Составы жирных кислот приведены по [11] за исключением атлантического лосося, жирнокислотный состав которого представлен по данным [12].

обычно содержат насыщенные жирные кислоты в позиции *sn*-2 — например, в молочном и свином жире пальмитиновая кислота изначально находится в позиции *sn*-2. Стереоспецифичность жирных кислот может быть важным фактором их влияния на нутритивную ценность пищевых продуктов. При переваривании ТАГ в кишечнике жирные кислоты из *sn*-1 и *sn*-3 позиций высвобождаются панкреатической липазой с образованием двух свободных жирных кислот и *sn*-2-моноацилглицерина. Если высокомолекулярные насыщенные жирные кислоты находятся в положениях *sn*-1 и *sn*-3, то их усвояемость ниже, поскольку свободные жирные кислоты образуют при гидролизе панкреатической липазой нерастворимые соли кальция, то есть перемещение высокомолекулярных насыщенных жирных кислот в *sn*-2-положение может повысить их усвояемость детьми. Поскольку высокомолекулярные насыщенные жирные кислоты в *sn*-1 и *sn*-3-позициях плохо усваиваются, они дают меньшую калорийность [13] и меньше влияют на липидный профиль крови. Например, когда в животном жире жирные кислоты распределены случайным образом и пальмитиновая кислота преимущественно находится в *sn*-1 и *sn*-3-позициях, то содержание пальмитиновой кислоты в плазме крови возрастает в меньшей степени, чем при употреблении немодифицированного животного жира, в котором 65% пальмитиновой кислоты находится в позиции *sn*-2. Такие структурированные ТАГ, как Салатрим (*Salatrim*), обладают меньшей энергетической ценностью, чем обычный жир, поскольку в них выше содержание стеариновой кислоты ($C_{18:0}$) в позициях *sn*-1 и *sn*-3 (см. далее раздел 4.8.2).

4.2.3. Фосфолипиды

Фосфолипиды или фосфоглицериды являются разновидностью триацилглицеринов, где фосфатные группы находятся обычно в положении *sn*-3 (см. рис. 4.3 со структурами фосфолипидов). Простейший фосфолипид — это фосфатидная кислота (ФК), где заместителем гидроксила в положении *sn*-3 является фосфатная группа. Другие заместители в фосфатной группе при *sn*-3 дают фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилинозитол (ФИ) (рис. 4.3). Номенклатура фосфолипидов подобна триацилглицеринам — название и положение фосфатной группы указывают в конце всей структуры (например, 1-пальмитоил-2-стеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин). Термин «лизо» обозначает, что жирная кислота входила в состав фосфолипида. В пищевой промышленности лизофосфолипиды обычно относят к фосфолипиду, в котором жирная кислота была удалена из положения *sn*-2. Официальная номенклатура *IUPAC* требует, чтобы указывалась стереоспецифичность положения удаленной жирной кислоты (например, 2-лизофосфолипиды). ФХ известен как лецитин, однако реализуемый как пищевая добавка, это обычно не чистый лецитин — он содержит смесь разных фосфолипидов и другие компоненты.

Наличие у фосфолипидов полярной фосфатной группы делает эти соединения поверхностно-акивными, благодаря чему они располагаются бислоями, что оказывает существенное влияние на свойства биологических клеточных мембран. Поскольку клеточным мембранам необходимо поддерживать текучесть, жирные кислоты фосфолипидов зачастую ненасыщены и предотвращают кристаллизацию при комнатной температуре. Жирные кислоты в позиции *sn*-2 обычно более ненасыщены, чем в позиции *sn*-1. Ненасыщенные жирные кислоты в положении *sn*-2 могут высвобождаться фосфолипазой с использованием в качестве субстрата ферментов, например, циклооксигеназы и липоксигеназы (*LOX*). Благодаря поверхностной активности фосфолипидов их можно использовать для изменения физических свойств липидов, поскольку они действуют как эмульгаторы и влияют на поведение липидов при кристаллизации.



X = OH = Фосфатидная кислота

X = O—CH_2—CH_2—NH_2 = Фосфатидилэтаноламин

X = O—CH_2—CH_2—$N^+(CH_3)_3$ = Фосфатидилхолин

X = O—CH_2—$CH(NH_2)$—COOH = Фосфатидилсерин

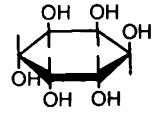
X =  = Фосфатидилинозитол

Рис. 4.3. Структуры фосфолипидов, типичных для пищевых продуктов

4.2.4. Сфинголипиды

В структуре сфинголипидов обычно присутствует сфингоидное основание сфингозин. К наиболее распространенным сфинголипидам относятся сфингомиелины (сфингофосфолипид, рис. 4.4), керамиды, цереброзиды и ганглиозиды. Эти липиды присутствуют в мембранах клеток нервной ткани и обычно не относятся к основным компонентам пищевых жиров.

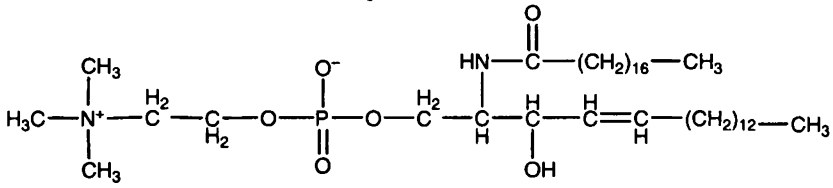
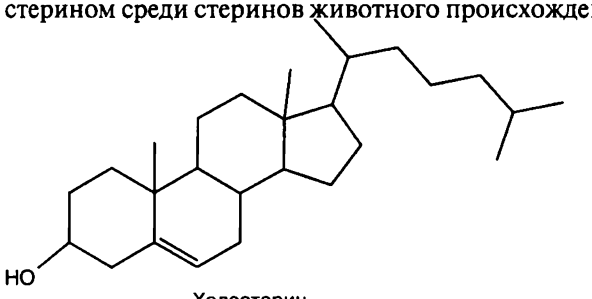


Рис. 4.4. Структура сфингомиелина (типичного сфинголипида)

4.2.5. Стерины

Стерины являются производными стероидов. Это неполярные липиды, имеющие в своем составе три шестизвенных и одно пятизвенное кольца, присоединенное к алифатической цепи (рис. 4.5). Гидроксильная группа у стеринов присоединена к 3-му атому углерода в кольце А. Сложные эфиры стеринов — это эфиры стерина с жирной кислотой, присоединенной к гидроксильному атому 3-го атома углерода. Стерины присутствуют как в растительных тканях (фитостерины), так и в животных (зоостерины). Важнейшим стерином среди стеринов животного происхождения является холестерин. В липидах растений много разных стеринов, но преобладают β-ситостерин и стигмастерин. Меньше всего в растениях холестерина. Гидроксильная группа при 3-м атоме углерода придает этим соединениям поверхностно-активные свойства, то есть холестерин самоориентируется в клеточной мембране и стабилизирует ее структуру. Холестерин также важен как предшественник синтеза желчных кислот и 7-дегидрохолестерина, который в свою очередь является предшественником витамина D, образующегося в коже под действием УФ-излучения [14]. Высокий уровень холестерина в крови и, в частности, в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) обусловливает повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний, то есть очень важно снизить уровень холестерина, потребляемого с пищей. Для этого следует уменьшить потребление животных жиров и/или удалять из них холестерин путем надкритической CO_2-экстракции или молекулярной дистилляции. Потребляемые с пищей фитостерины уменьшают всасывание холестерина в кишечнике и, следовательно, ими можно обогащать пищевые продукты в целях снижения уровня холестерина в крови (см. далее разделы 4.8.1.1.1—4.8.1.1.4).



Холестерин



β-ситостерин

Рис. 4.5. Структурные формулы стеринов, присутствующих в пищевых продуктах

4.2.6. Воски

В строгом химическом смысле воски — это сложные эфиры высших монокарбоновых кислот и высших одноатомных спиртов. Промышленные и пищевые воски представляют собой смесь соединений разных химических классов, включая сложные эфиры восков и стеринов, кетоны, альдегиды, спирты, углеводы и стерины [14]. Воски классифицируют по их происхождению: животного происхождения (пчелиный воск), растительного происхождения (карнаубский воск) и минерального происхождения (воски

из нефтепродуктов). Воски на поверхности растительных и животных тканей предохраняют организм от потери или впитывания влаги. Воски обычно наносят на поверхность фруктов в целях снижения их обезвоживания при хранении.

4.2.7. Прочие жиры

К прочим пищевым жирам относят жирорастворимые витамины (A, D, E и K) и каротиноиды, которым посвящены другие главы этой книги.

4.3. Физико-химические свойства липидов

В этом разделе мы рассмотрим в первую очередь физические свойства липидов и их влияние на свойства пищевых продуктов. В частности, речь пойдет о том, как молекулярная структура и строение липидов определяют их технологические свойства (характеристики плавления, морфологию кристаллов и взаимодействия) и как эти свойства обусловливают основные физико-химические и органолептические свойства пищевых продуктов (текстуру, стабильность, внешний вид, вкус и аромат).

Несмотря на то что в пищевых продуктах присутствуют самые разные липиды, основное внимание в этом разделе мы уделим триацилглицеринам, так как они широко распространены в природе и имеют важное значение в питании. Как было отмечено, триацилглицерины —это сложные эфиры молекулы глицерина и трех молекул жирных кислот, каждая из которых может иметь разное количество атомов углерода, степень ненасыщенности и разветвленности (см. раздел 4.2). Существование различных типов жирных кислот и то, что они могут располагаться в разных позициях в структуре глицерина, означает, что в пищевых продуктах могут присутствовать самые разные ТАГ. Фактически в потребляемых с пищей жирах и маслах всегда содержится большое количество различных ТАГ, тип и содержание которых определяется источником их происхождения [15–17].

Молекулы ТАГ напоминают по форме камертон — две жирные кислоты по концам молекулы глицерина, ориентированные в одном направлении и одна жирная кислота в позиции *sn*-2, ориентированная в противоположную сторону (рис. 4.6). Это в основном неполярные молекулы, и главным типом межмолекулярного взаимодействия, определяющего их структурную организацию, являются ван-дер-ваальсовы силы и силы стерического отталкивания [18]. Взаимодействие между двумя молекулами может быть описано парным потенциалом *w(s)*, определяющим силу взаимодействия или отталкивания между молекулами на расстоянии *s* (рис. 4.7).

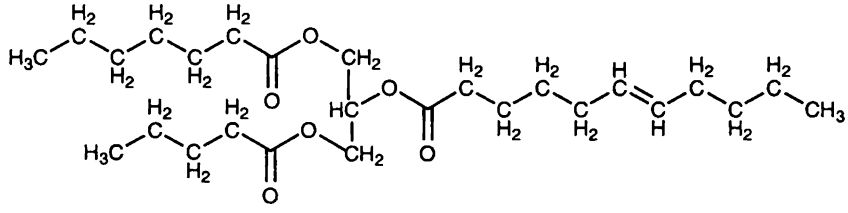


Рис. 4.6. Структурная формула триацилглицерина, состоящего из трех жирных кислот, присоединенных к молекуле глицерина

На некотором расстоянии между молекулами s^* находится минимальный экстремум межмолекулярного парного потенциала, свидетельствующий о наиболее стабильном состоянии. Величина s^* является мерой среднего расстояния между ТАГами, при этом значение экстремума парного потенциала величиной $w(s^*)$ является мерой среднего расстояния между ТАГами, при этом значение экстремума парного потенциала величиной $w(s^*)$ является мерой сил притяжения, удерживающих молекулы вместе в твердом и жидком состоянии (см. рис. 4.7). Структурная организация молекул в ТАГах прежде всего определяется их физическим состоянием, зависящим от соотношения между силами притяжения молекул и дезинтегрирующими силами тепловой энергии. Липиды находятся в жидком состоянии при температурах выше точки плавления, а в твердом — при температурах, которые ниже точки плавления настолько, что преодолевается эффект переохлаждения (об этом см. далее).

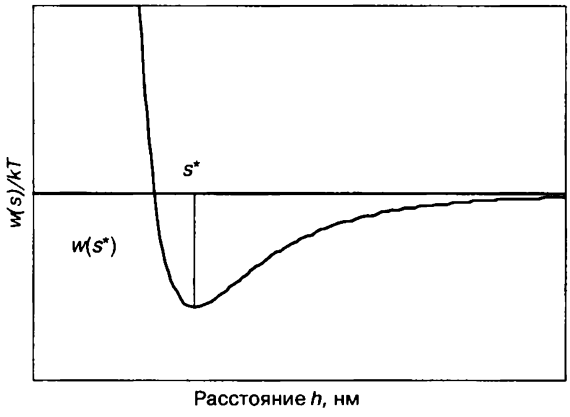


Рис. 4.7. Сила притяжения между молекулами липидов зависит от экстремума межмолекулярного потенциала

Молекулы липидов как в жидком, так и в твердом состоянии могут принимать различные структурные формы в зависимости от определенных молекулярных характеристик (например, длины цепи, степени ненасыщенности, полярности) [19, 20]. В твердом состоянии форма липидных молекул может меняться несколькими способами, включая организацию молекул ТАГ в целом относительно друг друга, угол наклона молекул внутри кристаллической решетки и упаковку углеводородной цепи. Все это означает, что кристаллы жира могут существовать в нескольких полиморфных кристаллических состояниях (см. далее), обладающих разными физическими свойствами и поведением при плавлении. Молекулы ТАГов даже в жидком состоянии находятся не в хаотичном, а в некотором упорядоченном состоянии из-за самоорганизации липидных молекул в некие структурные области (например, ламеллярные структуры) [19, 21]. Размер и число этих структурных областей с повышением температуры уменьшается.

Следует отметить, что словом «жир» обычно называют липиды, которые при комнатной температуре находятся в твердом состоянии, а словом «масло» — жидкие липиды, хотя зачастую эти термины взаимозаменяемы [22, 23].

4.3.1. Физические свойства триацилглицеринов

Физические свойства пищевых жиров и масел зависят от молекулярной структуры, их взаимодействий и структурной организации входящих в их состав молекул триацилглицеринов [20, 23–28]. В частности, термическое поведение, плотность и реологические свойства определяются в основном силой притяжения между молекулами и эффективностью их упаковки в конденсированной фазе (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Некоторые основные физико-химические свойства жидкого масла (триолеина) и воды при температуре 20 °С

Свойство	Масло	Вода
Молекулярная масса	885	18
Точка плавления, °С	5	0
Плотность, кгм$^{-3}$	910	998
Сжимаемость, м·с^2·кг$^{-1}$	$5{,}03 \cdot 10^{-10}$	$4{,}55 \cdot 10^{-10}$
Вязкость, мПа·с	≈50	1,002
Теплопроводность, Вт·м$^{-1}$·К$^{-1}$	0,170	0,598
Удельная теплоемкость, Дж·кг$^{-1}$·К$^{-1}$	1980	4182
Коэффициент термического расширения, °С$^{-1}$	$7{,}1\ 10^{-4}$	$2{,}1\ 10^{-4}$
Диэлектрическая постоянная	3	80,2
Поверхностное натяжение, мН·м$^{-1}$	≈35	72,8
Показатель преломления	1,46	1,333

4.3.1.1. Реологические свойства

Большинство жидких масел представляют собой ньютоновские жидкости с вязкостью при комнатной температуре обычно от 30 до 60 мПа·с [24, 29]. Тем не менее, касторовое масло более вязкое, чем большинство других масел из-за содержания в нем значительной доли жирных кислот со спиртовой группой в углеводородном каркасе (например, рицинолеиновой кислоты), которые способны образовывать относительно сильные водородные связи с соседними молекулами [24]. Вязкость жидких масел с ростом температуры постепенно уменьшается и может быть описана логарифмическим уравнением [29].

Большинство «твердых жиров» на самом деле состоит из смеси кристаллов жира, диспергированных в жидком жировом матриксе. Реологические свойства этих жиров существенно зависят от содержания, морфологии, взаимодействий и организации кристаллов жира в данной системе [20, 23]. Твердые жиры обычно проявляют так называемую «пластичность». Пластичные материалы проявляют свойства твердых тел при напряжениях ниже так называемого предела текучести (τ_0), но при более высоких напряжениях они ведут себя как жидкости. Реологическое поведение идеальных пластичных материалов (бингамовская вязкость) показано на рис. 4.8. Для некоторого приложенного напряжения сдвига реологические свойства таких материалов могут быть описаны следующими уравнениями [23]:



Рис. 4.8. Идеальное пластичное вещество при напряжениях ниже приложенного сдвига (предела текучести, τ_0) ведет себя как твердое тело, а при более высоких напряжениях — как жидкость

$$\tau = G\gamma \text{ (для } \tau < \tau_0), \quad (4.1)$$

$$\tau - \tau_0 = \eta\,\dot{\gamma} \text{ (для } \tau \geq \tau_0), \quad (4.2)$$

где τ —приложенное напряжение сдвига; γ— результирующая деформация сдвига; $\dot{\gamma}$ — скорость деформации сдвига; G — модуль сдвига (относящийся к прочности или жесткости материала при реакции на деформацию сдвига); η — вязкость; τ_0 — предел текучести (точка, в которой вещество начинает течь).

На практике твердые жиры характеризуются неидеальным пластичным поведением. Например, выше предела текучести твердые жиры могут течь не так, как идеальные жидкости, то есть они ведут себя как неньютоновское жидкости. Ниже предела текучести они могут быть неидеальными твердыми телами, проявляя определенные текучие свойства (например, вязкопластичные). Кроме того, предел текучести характеризуется не каким-то определенным значением, а некоторой областью приложенного напряжения сдвига из-за постепенного разрушения структуры кристаллической жировой решетки [30]. Значение предела текучести жиров с увеличением содержания твердого жира (СТЖ) возрастает, причем у такой кристаллической морфологии, которая способна образовывать трехмерные сети, легко заполняющие объем, оно выше (например, маленьких игольчатых кристаллов). Детальное описание характеристик пластичности жиров представлено в разных работах (см., в частности, [23]).

Структурные характеристики пластичности твердых жиров можно объяснить их способностью образовывать трехмерные сети из мелких жировых кристаллов, диспергированных в жидком матриксе [23, 31]. Ниже определенного значения приложенного напряжения сдвига происходит небольшая деформация образца, но слабые связи между кристаллами жиров не разрушаются. При превышении предела текучести эти слабые связи разрушаются, и кристаллы жира «скользят» относительно друг друга, приводя к течению образца. Если устранить воздействующую силу, то течение останавливается, и соседние кристаллы жира начинают снова образовывать между собой связи. Скорость этого процесса может иметь важное значение для технологических свойств пищевого продукта. Далее мы рассмотрим влияние реологических свойств триацилглицеринов на физико-химические и органолептические свойства продуктов.

4.3.1.2 Плотность

Плотность жира — это масса вещества, заданного объема [32]. Эта информация часто бывает важна при разработке пищевых технологий, поскольку она позволяет определить количество вещества, помещающегося в резервуар, или его расход через трубу заданного сечения. Плотность жиров важна также для определенных видов их применения, поскольку она влияет на общие свойства системы (например, образование крема из капель масла в эмульсии типа масло-в-воде зависит от разницы плотностей масляной и водной фаз) [33]. Плотность жидких жиров при комнатной температуре составляет около 910–930 кг/м^3 и с увеличением температуры уменьшается [24]. Плотность твердого жира составляет около 1000–1060 кг/м^3 и с увеличением температуры также уменьшается. Во многих пищевых продуктах жиры имеют частично кристаллическую структуру, и их плотность зависит от общего содержания твердого жира, а именно от доли общей затвердевшей жировой фазы. Плотность такого частично кристаллического жира с увеличением содержания твердого жира увеличивается (например, при охлаждении ниже температуры кристал-

лизации). Для определения содержания твердого жира иногда используют измерение плотности частично кристаллических жиров.

Плотность конкретного жира зависит от эффективности упаковки молекул ТАГ: чем она эффективнее, тем выше плотность. Триацилглицерины с линейными насыщенными кислотами более компактны, чем ТАГ с разветвленными ненасыщенными жирными кислотами, и поэтому их плотность выше [22, 23]. Более высокая плотность твердых жиров по сравнению с жидкими обусловлена тем, что их молекулы упакованы более компактно, но так бывает не всегда [34]. Например, для жировых систем с высоким содержанием чистых триацилглицеринов, кристаллизующихся в узком диапазоне температур, плотность системы в целом при кристаллизации на самом деле уменьшается из-за образования пустот.

Термические свойства. Наиболее важными термическими свойствами жиров с практической точки зрения является удельная теплоемкость (C_p), теплопроводность (к), точка плавления (T_{mp}) и энтальпия плавления (ΔH_f) [24]. Эти термические характеристики определяют общее количество теплоты, необходимой для передачи жировой системе (или отвода от нее) определенной температуры в единицу времени. Удельная теплоемкость большинства жидких и твердых жиров составляет около 2 Дж/г и возрастает с повышением температуры [24]. Жиры относительно плохо проводят тепло (~0,165 Вт/(м·с)), их теплопроводность намного меньше, чем у воды (~0,595 Вт/(м·с)). Таблицы термических свойств разных видов жидких и твердых жиров приведены в многочисленных работах, в том числе в [24, 29], некоторые данные из которых представлены в табл. 4.3.

Температура и точка плавления жиров зависит от упаковки молекул ТАГ внутри образованных кристаллов: чем эффективнее упаковка, тем выше темература и энтальпия плавления [18, 23]. Кроме того, температура и точка плавления чистых ТАГов возрастают с увеличением длины цепи. Эти величины выше:

- для насыщенных жирных кислот по сравнению с ненасыщенными;
  неразветвленных по сравнению с разветвленными;
  ТАГ с более симметричным распределением жирных кислот на молекуле глицерина;
  транс-изомеров по сравнению с *цис*-изомерами ненасыщенных жирных кислот (см. табл. 4.4);
  более стабильных полиморфных форм.

Степень кристаллизации жиров во многом определяет их влияние на общие физико-химические и органолептические свойства пищевых продуктов. Более подробно мы рассмотрим эти вопросы в следующих разделах.

Для некоторых видов применения (например, при жарке или выпечке) важно знать температуру, при которой жиры начинают разрушаться под действием тепла. Термостойкость жиров характеризуется температурами дымообразования, вспышки и воспламенения [32]. Температура дымообразоания — это температура, при которой в ходе испытаний в определенных условиях образец начинает дымить. Температура вспышки — это температура, при которой летучие соединения липидов начинают образовываться с такой скоростью, что они временно воспламеняются в пламени, но не поддерживают горения. Температура вос-

Таблица 4.4

Температура и точка плавления наиболее стабильных полиморфных форм некоторых ТАГ. По [23]

Тип ТАГ	Точка плавления, °С	ΔH, Дж/г
LLL	46	186
MMM	58	197
PPP	66	205
SSS	73	212
OOO	5	113
LiLiLi	–13	85
LnLnLn	–24	
SOS	43	194
SOO	23	—

Обозначения: *L* — лауриновая кислота ($C_{12:0}$), *M* — миристиновая кислота ($C_{14:0}$), *P* — пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$), *S* — стеариновая кислота ($C_{18:0}$), *O* — олеиновая кислота ($C_{18:1}$), *Li* — линолевая кислота ($C_{18:2}$), *Ln* — линоленовая кислота ($C_{18:3}$).

пламенения — это температура, при которой летучие соединения образуются под действием термического распада так быстро, что их горение продолжается и после применения пламени. Измерение этих температур важно для подбора жиров для использования при высоких температурах (например, при выпечке или жарке). Термостабильность триацилглицеринов намного больше, чем свободных жирных кислот, то есть склонность липидов к разрушению при нагревании определяется количеством содержащихся в них летучих органических соединений типа свободных жирных кислот [32].

Оптические свойства. Знание оптических свойств необходимо для пищевых химиков по нескольким причинам. Во-первых, оптические свойства липидов влияют на внешний вид многих пищевых материалов [35]. Во-вторых, некоторые оптические свойства могут быть использованы для получения информации о составе и качестве липидов [24, 32]. Важнейшими такими свойствами являются показатель преломления и спектры поглощения. Показатель преломления жидких жиров составляет при комнатной температуре примерно 1,43–1,45 [24]. Для конкретных жиров он определяется структурой жирных кислот, входящих в состав их молекул, и возрастает с увеличением длины цепи, числа двойных связей и сопряженности (конъюгированности) двойных связей [24]. Существуют эмпирические формулы, связывающие молекулярную структуру липидов с показателем преломления [24], то есть измерение показателя преломления может быть использовано для определения средней молекулярной массы или степени ненасыщенности жирных кислот. Измерение УФ-видимого спектра жиров дает много информации об их составе, качестве и молекулярных свойствах (например, о наличии конъюгированных двойных связей, каротиноидов или хлорофилла) [32]. Так, конъюгированные диены поглощают УФ-излучение с длиной волны 232 нм, тогда как конъюгированные триены — примерно 270 нм.

Спектр поглощения жира определяет внешний вид готового продукта. Чистые триацилглицерины практически не имеют своего цвета, поскольку у них нет групп, поглощающих свет в видимой области спектра, однако реализуемые растительные масла имеют свой цвет, так как в них присутствуют значительные добавки поглощающих свет пигментов (например, каротиноидов и хлорофилла). Именно поэтому пищевые масла зачастую перед рафинированием обесцвечивают. В эмульгированных продуктах жиры делают их мутными из-за рассеяния света благодаря разнице между коэффициентами преломления жировой и водной фаз.

Электрические свойства. Очень важно знать электрические свойства, поскольку некоторые аналитические методы, применяющиеся при анализе жирных кислот, основаны на измерении их электрических характеристик. Например, путем измерения электропроводимости можно определить содержание жира, а размеры глобул жира можно определить с помощью электрических импульсов [33]. Жиры характеризуются довольно низкой диэлектрической постоянной ($\varepsilon_R \approx 2–4$) из-за низкой полярности молекул ТАГ (см. табл. 4.3). Диэлектрическая постоянная чистых ТАГов возрастает с увеличением полярности (например, при наличии гидроксильных групп или при окислении), а также с уменьшением температуры [24]. Кроме того, жиры обладают небольшой электроповодностью и относительно большим сопротивлением.

4.3.2. Кристаллизация и плавление пищевых жиров

Физическое состояние (твердое или жидкое) жиров во многих пищевых продуктах играет важную роль в их производстве и определяет показатели качества [20]. Например, общие физико-химические и органолептичесие свойства таких продуктов, как маргарин, сливочное масло, мороженое, взбитые сливки и мучные кондитерские изделия во многом зависят от хода кристаллизации содержащихся в них жиров. Получение пищевых продуктов с заданными свойствами, следовательно, во многом обусловлено пониманием основных факторов, определяющих процессы кристаллизации и плавления пищевых жиров [19, 23, 26].

Содержание твердого жира (твердых триглицеридов). Физическое состояние жиров в продуктах обычно характеризуется понятием «содержание твердого жира» (СТЖ), то есть долей (0–1) или процентом (0–100%) липидов, твердых при данной температуре. Зависимость СТЖ от температуры является основным критерием выбора конкретных жиров для определенного вида применения, поскольку это определяет эффективность производственного процесса и конечные свойства многих жиросодержащих продуктов. Кривая плавления чистых ТАГ представлена на рис. 4.9, где СТЖ уменьшается от 100% до нуля при повышении температуры выше точки плавления. Для чистых ТАГ переход из твердого в жидкое состояние происходит в узком интервале температур, близком к температуре плавления ($T_{пр}$). Температура

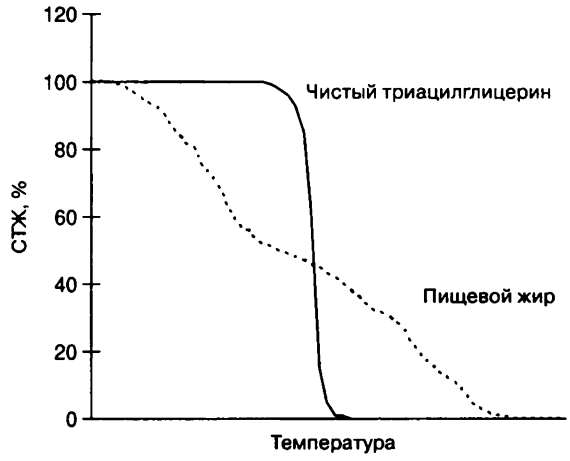


Рис. 4.9. Кривые плавления чистого триацилглицерина и обычного пищевого жира, который плавится в широком диапазоне температур, поскольку состоит из смеси различных молекул чистых ТАГ, каждый из которых имеет свою температуру плавления

плавления чистых ТАГ зависит от длины цепи, степени разветвленности и ненасыщенности соответствующих жирных кислот, а также от их расположения относительно молекулы глицерина (см. табл. 4.4). Съедобные жиры содержат смесь различных типов молекул ТАГов с разными температурами плавления, и поэтому они плавятся в широком интервале температур (в отличие от чистых ТАГ, рис. 4.9). Как мы уже отмечали, желаемые реологические свойства («пластичность») пищевых жиров обычно наблюдаются в диапазоне температур, характерных для частично кристаллизованного жира (в «зоне пластичности»).

Кривая плавления пищевых жиров является не просто взвешенной суммой участков плавления входящих в их состав ТАГов, поскольку ТАГ с большей температурой плавления растворим в ТАГе с меньшей температурой плавления [27]. Например, в смеси равных количеств тристеарина и триолеина при температруре 60 °С 10% твердого тристеарина можно растворить в жидком триолеине [22, 28]. Растворимость твердого компонента в жидкой фазе можно предсказать при условии, что их температуры плавления существенно различаются (> 20 °С):

$$\ln x = \frac{\Delta H_{fus}}{R}\left[\frac{1}{T_{mp}} - \frac{1}{T}\right], \tag{4.3}$$

где x — растворимость (в мольной доле) компонента с более высокой точкой плавления в компоненте с более низкой точкой плавления; ΔH_{fus} — молярная теплота плавления [22].

Кроме того, характеристики плавления пищевых жиров зависят от природы присутствующих жировых кристаллов (например, твердый раствор или смешанные кристаллы), их морфологии и полиморфных форм (см. об этом далее).

СТЖ жирных кислот обычно измеряют калориметрическими или дилатометрическими методами, а также методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Наиболее предпочтительны для измерения СТЖ ЯМР-методы, поскольку для них требуется небольшое количество образца, а измерение проводится быстро и просто [36]. СТЖ — важный параметр пищевых жиров, поскольку оно отражает качество продукта, в частности, степень кристаллизации при холодильных температурах, которая влияет на температуру помутнения и стабильность эмульсии. Ход плавления при различных температурах влияет на «ощущение во рту», хлебопекарные характеристики и мажущиеся свойства жиров при холодильных и комнатных температурах.

Как мы уже отмечали, кривая зависимости съедобных жиров «СТЖ–температура» определяет многие технологические и органолептические свойства многих жиросодержащих продуктов [16, 22, 27, 28, 37]. Нам важно, например, чтобы маргарин был достаточно твердым при холодильном хранении или при реализации в условиях комнатных температур, но при этом он должен быть достаточно мягок, чтобы его можно было намазать ножом [38]. Кроме того, важно, чтобы кристаллы жира таяли при разжевывании с формированием желаемого «ощущения во рту». Именно поэтому важно использовать жиры с зависимостями «СТЖ–реологические свойства» и «СТЖ–температура», соответствующими требуемому виду применения [23].

4.3.3. Физико-химические основы фазовых изменений жиров

Упорядочение молекул триацилглицеринов в твердом и жидком состояниях схематически представлено на рис. 4.10. Физическое состояние ТАГ при определенной температуре зависит от свободной энергии, складывающейся из вкладов энтальпийного и энтропийного членов: $\Delta G_{тв.\rightarrow жид.} = \Delta H_{твю\rightarrow жид.} - T\Delta S_{тв\rightarrow жид.}$ [39]. Энтальпия $\Delta H_{тв.\rightarrow жид.}$ означает изменение общей силы межмолекулярного взаимодействия между ТАГами

в процессе превращения из твердого состояния в жидкое, тогда как энтропия $\Delta S_{тв.\to жид.}$ означает изменение в организации молекул в ходе процесса плавления. Сила связей между молекулами липидов в твердом состоянии больше, чем в жидком, поскольку молекулы упакованы более компактно, то есть $\Delta H_{тв.\to жид.}$ положительна (что нежелательно) и способствует твердому состоянию. С другой стороны, энтропия молекул жидких жиров выше, чем для твердых, и $\Delta S_{тв.\to жид.}$ положительна (что желательно) и способствует жидкому состоянию. При низких температурах энтальпийный фактор доминирует над энтропийным ($\Delta H_{тв.\to жид.} > T\Delta S\ S_{тв.\to жид.}$), то есть в твердом состоянии свободная энергия меньше [19, 23, 39].

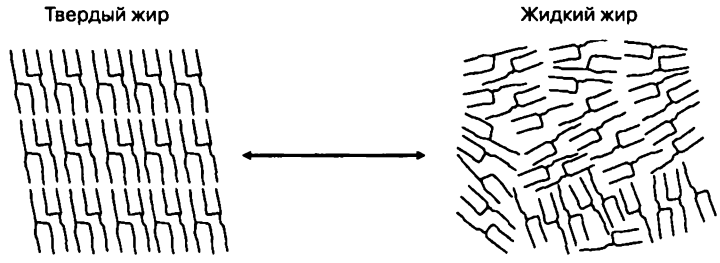


Рис. 4.10. Упорядоченность ТАГов в твердом и жидком состояниях зависит от соотношения сил притяжения молекул и термической энергии, нарушающей их ориентацию

При повышении температуры превалирует энтропийный вклад. При некоторой температуре, называемой точкой плавления, энтропийный фактор начинает доминировать над энтальпийным, и поэтому в жидком состоянии свободная энергия самая низкая.

Вещество переходит из твердого в жидкое состояние при температуре выше температуры плавления. Переход «твердое тело–жидкость» (плавление) — процесс эндотермический, поскольку для удерживания молекул на расстоянии друг от друга необходимо приложить энергию. И наоборот, переход «жидкость–твердое тело» (кристаллизация) — процесс экзотермический, поскольку при сближении молекул энергия выделяется. Хотя свободная энергия в твердом состоянии при температурах ниже точки плавления минимальна, твердые кристаллы не образуются до тех пор, пока жидкий жир не охладится ниже точки плавления, поскольку свободная энергия затрачивается на образование зардышей кристаллизации (см. далее).

В целом процесс кристаллизации жиров можно разделить на несколько стадий: переохлаждение, нуклеацию (образование зародышей или центров кристаллизации), рост кристалла и посткристаллизацию [19, 20, 23, 40].

4.3.3.1. Переохлаждение

Хотя твердое состояние жиров при температурах ниже точки плавления термодинамически более выгодно, до кристаллизации жиры продолжают оставаться в жидком состоянии в течение довольно длительного времени. Это обусловлено энергией активации, затрачиваемой на образование центров кристаллизации (ΔG^*), которую необходимо преодолеть для осуществления фазового перехода (рис. 4.11). Если энергия активации достаточно велика по сравнению с тепловой энергией, то кристаллизация не начнется, и система будет находиться в метастабильном состоянии. Величина энергии активации зависит от возможностей образования центров кристаллизации в жидком жире, из которых в дальнейшем растут кристаллы (см. далее). Степень переохлаждения некоторой жидкости определяется как $\Delta T = T - T_м$, где T — это температура, а $T_{пр}$ — точка плавления. Величина ΔT, при которой происходит начало кристаллизации, зависит от химической структуры жира, наличия в нем включений, скорости охлаждения, микроструктуры жировой фазы (например, объема, в котором эмульгирован жир) и величины приложенной внешней силы [19, 23]. Чистые беспримесные жиры до инициации кристаллизации зачастую могут быть переохлаждены более чем на 10 °C [41].

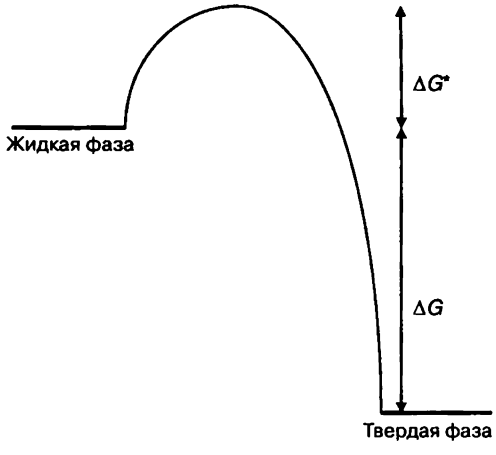


Рис. 4.11. При достаточно большой энергии активации, необходимой для образования зародышей кристаллизации, при температуре ниже точки плавления жидкий жир может существовать в метастабильном состоянии

4.3.3.2. Нуклеация

Рост кристалла начинается только после образования в жидкости стабильного центра кристаллизации. Считается, что такие центры представляют собой кластеры молекул жира, образующие слабоупорядоченные мелкие кристаллы, возникающие при столкновении нескольких молекул жира с образованием ассоциатов [19]. Именно изменение свободной энергий обусловливает образование такого центра (рис. 4.12).

Отрицательная величина изменения свободной энергии (ΔG_V) пропорциональна объему образующихся зародышей кристаллизации. Это обусловлено изменениями энтальпии и энтропии внутри центра кристаллизации при фазовом переходе. С другой стороны, образование центров кристаллизации ведет к формированию новой поверхности раздела твердой и жидкой фаз, причем этот процесс сопровождается ростом свободной энергии для преодоления межфазного напряжения. Положительная величина изменения свободной энергии (ΔG_S) пропорциональна площади поверхности образующихся центров кристаллизации. Общее изменение свободной энергии образования центров кристаллизации представляет собой сумму влияния объема и площади поверхности [19, 23]:

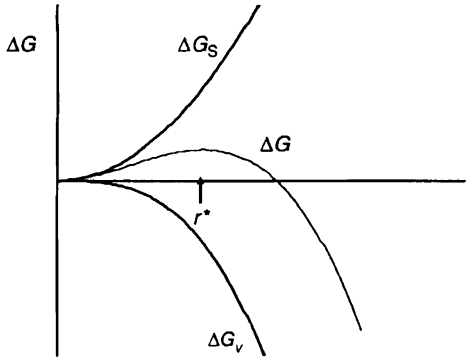


Рис. 4.12. Критический размер зародыша кристалла, необходимый для его роста, зависит от вклада объема и площади поверхности в свободную энергию образования центров кристаллизации. Спонтанно образованные зародыши кристаллов с радиусом больше r^* растут, а с меньшим радиусом распадаются

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_S = \frac{4}{3}\pi r^3 \frac{\Delta H_{fus}\Delta T}{T_{mp}} + 4\pi r^2 \gamma_i, \qquad (4.4)$$

где r — радиус центра кристаллизации; ΔH_{fus} — изменение энтальпии на единицу объема при переходе «жидкость–твердое тело» (отрицательное значение); γ_i —напряжение на разделе фаз «жидкость–твердое тело».

По мере роста центра кристаллизации вклад объемного члена становится все более отрицательным, тогда как вклад поверхностного члена становится все более положительным (см. рис. 4.12). Поскольку отношение площади поверхности к объему с увеличением размера уменьшается, для маленьких центров кристаллизации доминирует поверхностный член, тогда как для больших центров — объемный. В результате изменение общей свободной энергии при образовании центров кристаллизации становится максимальным при некотором критическом радиусе центра кристаллизации (r^*):

$$r^* = \frac{2\gamma_i T_{mp}}{\Delta H_{fus}\Delta T}. \qquad (4.5)$$

Если происходит спонтанное образование центров кристаллизации с радиусом менее этого критического размера, то происходит диссоциация и свободная энергия системы уменьшается. Если же образуются центры кристаллизации с радиусом, превышающим критический размер, то вырастает кристалл. Из уравнеиия (4.5) следует, что критический размер центра кристаллизации, необходимый для роста кристалла, по мере увеличения степени переохлаждения уменьшается, что согласуется с экспериментально наблюдаемой скоростью образования центров кристаллизации при понижении температуры. Практически это означает, что до начала образования кристаллов жидкие жиры должны быть значительно переохлаждены, (ниже их термодинамической точки плавления).

Скорость образования зародышей кристаллизации можно математически увязать с энергией активации ΔG^*, которую необходимо преодолеть для образования стабильных зародышей [19]:

$$J = A\exp(-\Delta G^*/kT), \qquad (4.6)$$

где J — скорость образования центров кристаллизации, равная числу стабильных центров, образующихся за 1 с в единице объема вещества; A — предэкспоненциальный множитель; k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура. Значение ΔG^* вычисляют подстановкой в уравнение (4.4) значение r из уравнения (4.5).

Изменение скорости образования центров кристаллизации по уравнению (4.5) в зависимости от степени переохлаждения (ΔT) приведено на рис. 4.13. Образование стабильных зародышей кристаллизации при температурах ниже точки плавления происходит крайне медленно, но существенно возрастает при охлаждении жидкости ниже некоторой температуры T^*. В действительности скорость образования центров кристаллизации возрастает по мере переохлаждения до некоторой температуры, после чего при дальнейшем охлаждении замедляется. Это происходит из-за диффузии молекул жиров к поверхности раздела фаз «жидкость–центр кристаллизации» [19, 42]. Тем самым на кривой зависимости скорости образования центров кристаллизации от степени переохлаждения наблюдается перегиб (см. рис. 4.13).



Рис. 4.13. Теоретически скорость образования стабильных зародышей кристаллов при переохлаждении должна возрастать (сплошная линия), но на практике она уменьшается до определенной температуры, поскольку диффузия молекул жира замедляется из-за увеличения вязкости (пунктирная линия)

Такой тип образования центров кристаллизации наблюдается у беспримесных жиров и называется *гомогенной нуклеацией* [19]. При контакте жидкого жира с инородными поверхностями (например, частиц пыли, кристаллами жира, жировыми глобулами, пузырьками воздуха или стенками емкости) образование центров кристаллизации происходит при более высоких температурах, чем у чистых систем [19, 23, 43]. Такой тип называется *гетерогенной нуклеацией* и может быть разделен на две разновидности: первичную и вторичную нуклеацию. Первичная гетерогенная нуклеация происходит, когда поверхности инородных тел имеют отличную от жира химическую структуру, тогда как вторичная — при контакте с поверхностью, состоящей из кристаллов одинаковой с жиром химической структуры. Вторичная гетерогенная нуклеация является основой для инициирования кристаллообразования в переохлажденных жирах [19], то есть для добавления заранее сформированных кристаллов триацилглицеринов в переохлажденную жидкость с теми же триацилглицеринами, что способствует нуклеации при более высоких температурах.

Гетерогенная нуклеация происходит тогда, когда на поверхности примесного вещества возможно образование термодинамически более стабильного зародыша кристаллизации, чем в чистом жире. В результате уменьшается степень переохлаждения, необходимая для инициации кристаллизации жира. С другой стороны, некоторые виды примесей способны снижать скорость нуклеации, поскольку они внедряются в поверхность растущего зародыша и препятствуют дальнейшему проникновению молекул жира [19]. Будут ли примеси ингибиторами или катализаторами кристаллизации, зависит от их молекулярной структуры и взаимодействия с зародышем кристаллизации [42, 44]. Следует отметить, что до сих пор ведутся дискуссии о создании действенной математической модели нуклеации, поскольку существующие в настоящее время теории зачастую дают величины скорости нуклеации, сильно отличающиеся от значений, полученных экспериментально [23]. Тем не менее, общая зависимость скорости нуклеации от температуры (см. рис. 4.13) достаточно хорошо согласуется с практикой.

4.3.3.3. Рост кристаллов

При образовании стабильного центра кристаллизации он начинает расти до кристалла путем включения молекул из жидкой жировой фазы на поверхности раздела «жидкость–твердое тело» [19, 23, 42]. Кристаллы жира имеют несколько различных граней, и каждая грань растет с разной скоростью, чем и обусловлено большое разнообразие морфологии кристаллов жира. Общая скорость роста кристаллов зависит от нескольких факторов, в том числе от процессов переноса массы молекул из жидкой фазы на поверхность раздела «жидкость–твердое тело», от инкорпорации молекул в кристаллическую решетку и от удаления теплоты, выделяющейся в ходе кристаллизации на поверхности раздела фаз [19]. Условия окружающей среды (вязкость, теплопроводность, кристаллическая структура, температурный профиль и механическое перемешивание) влияют на процессы переноса массы и теплоты и, следовательно, на скорость

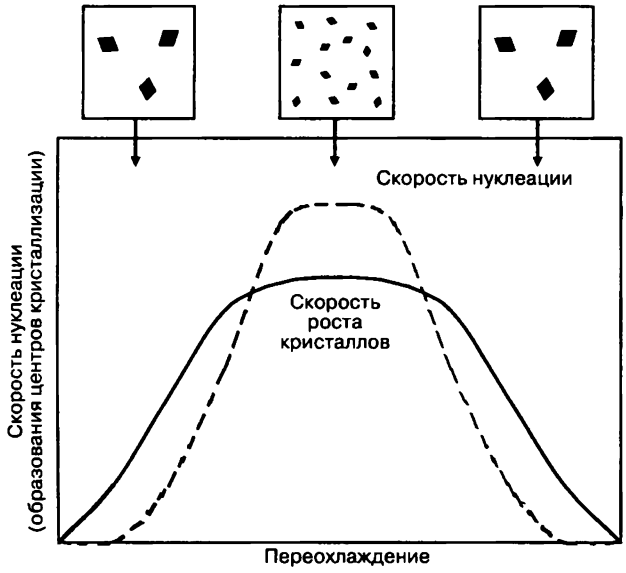


Рис. 4.14. Образование центров кристаллизации и скорость роста кристаллов характеризуются разными температурными зависимостями, что определяет разницу в числе и размерах кристаллов жира, образованных при различных условиях охлаждения

роста кристаллов. Она первоначально растет с увеличением степени переохлаждения до достижения некоторой максимальной скорости, после чего начинает снижаться [19]. Зависимость скорости роста от температуры характеризуется тем же профилем, что и образование центров кристаллизации, однако максимальная скорость образования последних достигается обычно при температуре, отличной от температуры максимальной скорости роста кристалла (рис. 4.14). От этой разницы скоростей зависят число и размеры кристаллов, образованных при данной скорости охлаждения и поддерживаемой температуре. Если быстро охладить жидкую жировую фазу до некоторой температуры, при которой скорость нуклеации меньше скорости роста кристаллов, то будет наблюдаться образование небольшого количества крупных кристаллов, в случае же охлаждения жидкой жировой фазы до температуры, при которой скорость нуклеации больше скорости роста кристаллов, будет образовываться больше мелких кристаллов.

4.3.3.4. Посткристаллизационные процессы

После образования кристаллов в жировой среде происходят дальнейшие изменения их упаковки, размеров, состава и типа взаимодействий, несмотря на то что общий состав ТТГ может оставаться постоянным [19, 23]. Процессы посткристаллизации могут включать изменение полиморфов от менее стабильных к более стабильным формам из-за перегруппировки молекул триацилглицеринов внутри кристаллов. Если липиды образуют смешанные кристаллы (кристаллы с различными типами триацилглицеринов), то при хранении может наблюдаться изменение в составе кристалла из-за диффузии молекул триацилглицеринов между кристаллами. Может также наблюдаться общее увеличение средних размеров кристаллов в жировой фазе со временем благодаря созреванию Оствальда, то есть увеличению размеров более крупных кристаллов за счет мелких из-за диффузии молекул липидов между кристаллами [19]. И наконец, при хранении могут усиливаться связи между кристаллами жира по механизму агломерации (например, сплавление кристаллов друг с другом) [23, 27, 28]. Все эти посткристаллизационные изменения могут существенно влиять на общие физико-химические и органолептические свойства продуктов и, следовательно, понимать и уметь регулировать эти процессы очень важно. Например, посткристаллизационные процессы зачастую приводят к увеличению размеров кристаллов, что во многих случаях нежелательно, поскольку придает продукту при потреблении «песчанистый» привкус [43].

4.3.4. Кристаллическая структура

4.3.4.1. Морфология кристаллов

Термин «морфология» применяют по отношению к размеру, форме и расположению кристаллов, образующихся при кристаллизации жидкостей. Морфология кристаллов зависит от внутренних (молекулярная структура, состав, упаковка и взаимодействия) и внешних факторов (зависимость «время–температура», механическое перемешивание и наличие примесей). Как правило, при быстром охлаждении жидкой жировой фазы намного ниже температуры плавления образуется большое число мелких кристаллов, а при медленном охлаждении чуть ниже температуры плавления образуется небольшое число крупных кристаллов [19, 23]. Это объясняется разницей в температурных зависимостях скоростей образования центров нуклеации и роста кристаллов (см. рис. 4.14). Скорость образования центров нуклеации с понижением температуры возрастает до некоторой максимальной величины намного быстрее, чем скорость кристал-

лизации, а затем по мере дальнейшего повышения температуры быстрее снижается. Таким образом, быстрое охлаждение способствует спонтанному образованию мелких зародышей кристаллов, которые последовательно вырастают в маленькие кристаллы, а медленное охлаждение способствует образованию небольшого числа зародышей, которые успевают вырасти в крупные кристаллы до образования новых центров кристаллобразования (см. рис. 4.14).

Структурные и физические свойства кристаллов, получающихся после охлаждения смеси триацилглицеринов, существенно зависят от скорости охлаждения и температуры [19, 23, 31]. При быстром охлаждении жидкой жировой фазы все триацилглицерины кристаллизуются примерно одновременно и образуется *твердый раствор*, состоящий из гомогенных кристаллов, в котором триацилглицерины смешаны друг с другом [22, 23]. При медленном охлаждении жидкой жировой фазы первыми кристаллизуются триацилглицерины с более высокой точкой плавления, тогда как триацилглицерины с более низкой точкой плавления кристаллизуются позднее, благодаря чему образуются *смешанные кристаллы*. Эти кристаллы гетерогенны и состоят из нескольких областей — в одних областях много триацилглицеринов с высокой точкой плавления, а в других их меньше. От того, образует ли жировая фаза твердый раствор или смешанные кристаллы, всегда зависят такие физико-химические свойства, как плотность, текучесть и характеристики плавления [22, 23], определяющие свойства готовых пищевых продуктов.

4.3.4.2. Полиморфизм

Триацилглицеринам присуще явление, называющееся (монотропным) *полиморфизмом* и отражающее существование нескольких кристаллических структур с различной упаковкой молекул [19, 23]. Три наиболее распространенных типа упаковки триацилглицеринов — это гексагональная, орторомбическая и триклинная упаковки, обозначаемые соответственно α, β′ и β полиморфными формами (рис. 4.15 и 4.16).

Образующиеся кристаллические формы зависят от молекулярной структуры и состава жиров, а также от условий окружающей среды при кристаллизации (скорости охлаждения, поддерживаемой температуры и сдвига). Термодинамическая стабильность, а значит и температура плавления этих трех форм, уменьшается в следующей последовательности: β > β′ > α. Большая стабильность характерна для большей плотности упаковки ацильных групп жирных кислот, преимущественно их гомогенных компонентов и симметрии группировок триацилглицеринов. Совместимость и разделение жирных кислот в кристаллической решетке обусловливает рост единичной ячейки с длинными протяженными пространственными структурами, равными по размеру двум или трем длинам цепочек жирных кислот (*L*2 и *L*3 на рис. 4.15). Хотя β-форма более термодинамически стабильна, триацилглицерины зачастую кристаллизуются сначала в α-форму, поскольку для нее характерна меньшая энергия активации зарождения центра нуклеации (рис. 4.17). Со временем кристаллы трансформируются в более стабильную полиморфную форму со скоростью, зависящей от условий

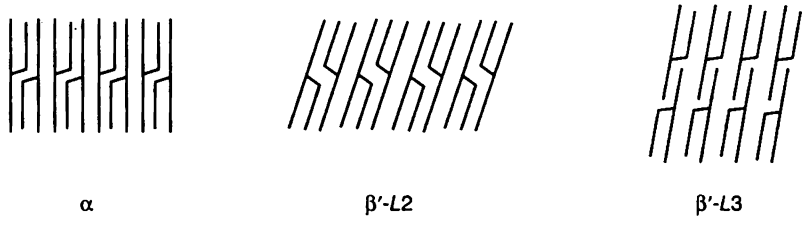


Рис. 4.15. Наиболее распространенные упаковки молекул триацилглицеринов в кристаллической фазе. По [23]

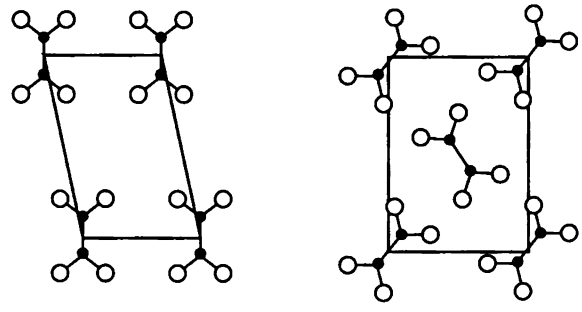


Рис. 4.16. Два наиболее распространенных типа упаковок углеводородной цепи — триклинная (параллельная) и орторомбическая (перпендикулярная) при виде сверху. Черными кружками обозначены атомы углерода, а белыми — атомы водорода. По [21]

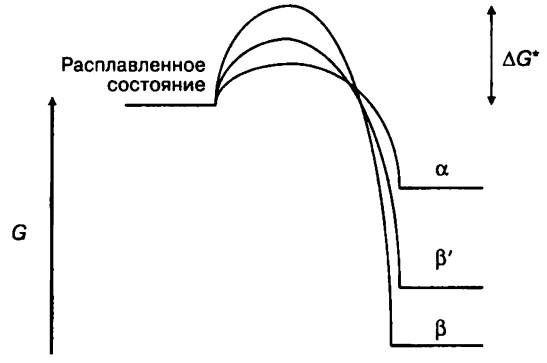


Рис. 4.17. Первоначально образующиеся полиморфные формы, когда кристаллизация жира зависит от относительной величины энергии активации, инициирующей образование центров нуклеации



Рис. 4.18. Отдельные ячейки кристаллического жира могут характеризоваться размерами

окружающей среды, а именно от температуры, давления и наличия примесей [27]. Время, необходимое для осуществления этого фазового перехода, определеяется гомогенностью состава триацилглицеринов [23]. Наиболее быстро переход из α-формы происходит при относительно гомогенном их составе, когда триацилглицерины имеют сходную молекулярную структуру, а медленнее переход осуществляется в случае многокомпонентных жиров с триацилглицеринами разной молекулярной структуры. Различные типы полиморфных форм жиров могут быть идентифицированы различными способами, включая рентгеновскую дифракцию, ДСК-, ИК-, ЯМР- и рамановскую спектроскопию [19]. Эти методы основаны на том, что различные полиморфные формы кристаллов имеют разную упаковку, что влияет на физико-химические и структурные свойства (см. рис. 4.15, 4.16 и 4.18). Знание полиморфных форм кристаллов жира зачастую имеет большое значение, поскольку от них зависят выбор термических процессов и морфология образующихся кристаллов, а значит, физико-химические и органолептические свойства пищевых продуктов. Так, желаемые текстурные характеристики и внешний вид таких продуктов, как маргарины, спреды, мучные кондитерские изделия и шоколад, зависят от стабильности образовавшихся кристаллов жира в соответствующей полиморфной форме [19, 38, 43]. Мелкие β'-кристаллы более предпочтительны в маргаринах и спредах, где требуются мягкость, пластичность и высокая степень покрытия поверхности диспергированной влагой. Более крупные β-формы предпочтительны в хлебопекарных шортенингах, где они обеспечивают «слоистость» и стабильность масла какао в шоколаде. Для контроля, будут ли β'- или β-формы доминирующие при обычном кристаллообразовании, можно использовать смеси жиров. Какие из пищевых жиров образуют наиболее стабильные β' или β-формы кристаллов, показано в табл. 4.2.

4.4. Переработка жиров. Выделение, очистка и модификация

4.4.1. Рафинирование

Триацилглицерины экстрагируют из источников как растительного, так и животного происхождения. *Вытапливание жира* — это операция термообработки, в ходе которой разрушают клеточные структуры в целях высвобождения триацилглицеринов из животных субпродуктов и отходов рыбопереработки. Триацилглицерины растительного происхождения выделяют путем прессования (например, оливок) или экстрацией растворителем (например, семян масличных растений), а также с помощью сочетания указанных способов (подробнее о технологии экстракции жиров и масел см. работу [45]. Полученные в ходе этих процессов неочищенные жиры и масла содержат не только триацилглицерины, но и свободные жирные кислоты, фосфолипиды, жирорастворимые вкусоароматические соединения и каротиноиды. Кроме того, в состав жиров и масел входят также и нежировые компоненты (белки и углеводы). Для получения жиров

и масел с требуемыми цветом, вкусом и сроком годности эти компоненты необходимо удалить. Далее мы рассмотрим основные стадии процесса рафинирования.

4.4.1.1. Дегуммирование

Присутствие фосфолипидов способствует формированию в жирах и маслах эмульсии типа «вода-в-масле». Такие эмульсии делают растительное масло более мутным, а присутствующая вода может быть опасной при нагревании масла выше 100 °С из-за разбрызгивания и вспенивания. Дегуммирование — это процесс удаления фосфолипидов. Осуществляют его путем добавления 1–3% воды температурой 60–80 °С в течение 30–60 мин. Для увеличиения содержания водорода в этой воде к ней иногда добавляют небольшие количества кислоты. Затем для удаления агрегированных «камедей», образованных фосфолипидами и водой, зачастую применяют отстаивание, фильтрование или центрифугирование. В производстве соевого масла фосфолипиды затем восстанавливают и реализуют как лецитин.

4.4.1.2. Нейтрализация

Из неочищенных масел необходимо удалить свободные жирные кислоты, поскольку они могут стать причиной образования постороннего привкуса, ускоряют окисление липидов, вызывают пенообразование и влияют на ход гидрирования и переэтерификации. Нейтрализацию проводят путем перемешивания неочищенного масла с раствором каустической соды, что приводит к образованию растворимых солей свободных жирных кислот, то есть к омылению. Эти мыла затем удаляют путем отделения жировой фазы от окружающей ее водной среды. Количество используемой каустической соды зависит от концентрации свободных жирных кислот в неочищенном масле. Образующиеся продукты омыляющих веществ можно использовать в виде кормов для скота, а также в производстве ПАВ и моющих средств.

4.4.1.3. Отбеливание

В неочищенных жирах и маслах зачастую содержатся пигменты (каротиноиды, госсипол и т. п.), придающие ненужное окрашивание или способствующие окислению липидов (хлорофилл). Пигменты удаляют путем смешивания горячего масла (температурой 80–100 °С) с такими абсорбентами, как нейтральные глины, синтетические силикаты, активированный уголь и др. Поглотитель затем удаляют при фильтровании. Отбеливание обычно проводят под вакуумом, поскольку абсорбенты могут ускорять окисление липидов. Дополнительным преимуществом отбеливания является попутное удаление остаточных свободных жирных кислот и фосфолипидов, а также расщепление гидропероксидов липидов.

4.4.1.4. Дезодорирование

В нерафинированном растительном масле содержатся ненужные ароматические соединения —альдегиды, кетоны и спирты, нативные или образованные в ходе реакций окисления липидов во время экстракции и очистки масла. Эти летучие соединения удаляют путем перегонки масла с водяным паром при высоких температурах (180–270 °С) и низком давлении. Процесс дезодорирования разрушает также гидропероксиды липидов, увеличивая тем самым стойкость масла к окислению, но может приводить и к образованию *транс*-изомеров жирных кислот. После окончания дезодорирования к растительному маслу добавляют лимонную кислоту (0,005–0,01%) в целях образования хелатных комплексов и инактивации металлов-катализаторов окисления. В дистилляте дезодорирующего средства содержатся токоферолы и стерины (фитостерины), которые можно регенерировать и использовать затем в качестве антиоксидантов и функциональных пищевых ингредиентов.

4.4.2. Изменение состава твердых триглицеридов в пищевых жирах

Натуральные жиры с необходимым диапазоном пластичности не всегда доступны, а иногда довольно дороги. Кроме того, изменение жирнокислотного профиля (снижение степени ненасыщенности) зачастую необходимо для получения жира, менее чувствительного к окислению, или для получения жира, более приемлемого с нутритивной точки зрения (повышение степени ненасыщенности). В этих целях были раз-

работаны различные технологии, основной задачей которых являлось изменение в пищевых жирах содержания твердых триглицеридов (ТТГ) или «общего твердого жира» (ОТЖ).

4.4.2.1. Смешивание

Простейший метод изменить жирнокислотный состав и кривую плавления — это смешивание жиров с разным составом ТАГ. Этот метод используют главным образом в производстве жарочных масел и маргаринов.

4.4.2.2. Изменение состава кормов для животных

Состав жирных кислот в животных жирах можно изменить путем коррекции типа жиров в кормах. Этот способ особенно эффективен для нежвачных животных — свиней и птицы, а также для рыбы. Увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот в рационе жвачных животных (коров и овец) не очень эффективно, поскольку бактерии рубца (первого отдела желудка жвачных) гидрогенизируют жирные кислоты прежде, чем они достигнут тонкой кишки, где они всасываются в кровь.

4.4.2.3. Генетические методы

Жирнокислотный состав можно генетически скорректировать путем замены ферментативных путей образования ненасыщенных жирных кислот. Такая генетическая коррекция доказала свою успешность в программах селекции пород скота и в технологиях генной инженерии. Некоторые растительные масла из генетически модифицированных растений (например, подсолнечное) с повышенным содержанием олеиновой кислоты уже производятся промышленно.

4.4.2.4. Фракционирование

Состав жирных кислот и ТАГов в жирах можно изменить путем выдержки жира при такой температуре, при которой наиболее насыщенные или высокомолекулярные ТАГ будут кристаллизоваться с последующим образованием либо твердой (более насыщенной и высокомолекулярной), либо жидкой (более ненасыщенной или низкомолекулярной) фаз. Так обычно поступают с растительными маслами в ходе процесса, известного как *вымораживание* (*винтеризация*). Эта технология необходима для тех масел, которые затем используют в замороженных пищевых продуктах, что помогает предотвратить кристаллизацию ТАГ и помутнение продукта. Вымораживание также необходимо для жиров, применяемых в производстве майонезов и салатных дрессингов (заправок), в которых кристаллизация жиров будет дестабилизировать эмульсию.

4.4.2.5. Гидрогенизация

Гидрогенизация — это химический процесс присоединения водорода к двойным связям. Его используют, во-первых, когда необходимо модифицировать жиры так, чтобы они были более твердыми при комнатной температуре, во-вторых, когда следует избежать различий в поведении жиров при кристаллизации (за счет большей гомогенности жирнокислотного состава), и в-третьих, для обеспечения большей стойкости к окислению. Гидрогенизацию осуществляют путем удаления двойных связей, что приводит к большей насыщенности жирных кислот. Кроме того, при гидрогенизации происходит отбеливание, так как разрушение двойных связей (например, в каротиноидах) приводит к утрате ими красящих свойств. К пищевым продуктам, получаемым путем гидрогенизации жиров, относятся маргарины, кулинарные жиры и частично гидрогенизированные масла, более стойкие к окислению.

Чтобы ускорить взаимодействие доставленного к субстрату газообразного водорода, реакцию гидрогенизации необходимо катализировать и осуществлять температурный контроль — сначала масло нагревают так, чтобы оно стало жидким, а затем, как только начнется экзотермическая реакция, охлаждают. Кроме того, для смешивания катализатора и субстратов необходимо перемешивание [45]. Гидрогенизируемое масло сначала рафинируют, поскольку примеси будут снижать эффективность гидрирования или «портить» катализатор. Гидрогенизацию проводят по периодической или непрерывной технологии при температурах от 250 до 300 °С. Наиболее широко распространенный катализатор — этот восстановленный

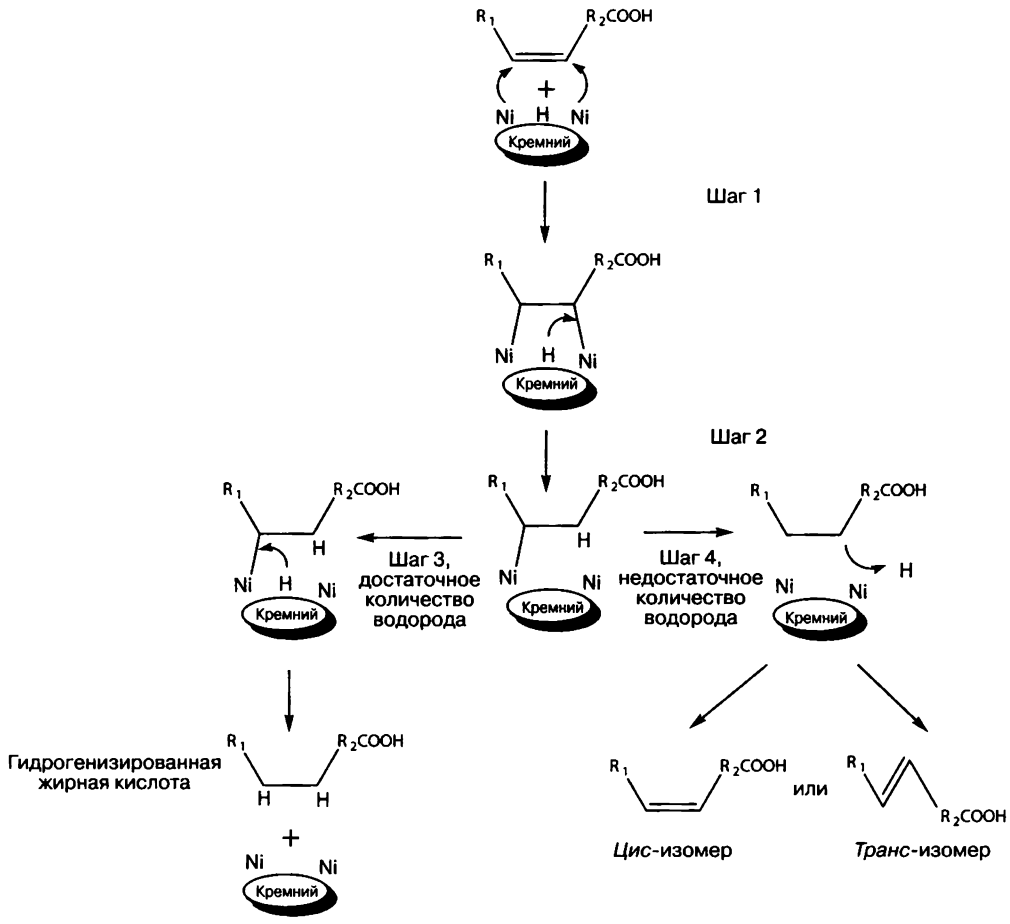


Рис. 4.19. Пути гидрогенизации жиров с образованием насыщенных жирных кислот, а также *цис-* и *транс*-изомеров ненасыщенных жирных кислот

никель (никель Ренея), который добавляют в количестве 0,01–0,02%. Чтобы катализатор с высокой площадью поверхности можно было легко регенерировать фильтрацией, никель вводят в структуру пористого носителя. Поскольку массоперенос реагентов ограничивает реакцию, очень важно непрерывное перемешивание. Вся реакция занимает 40–60 мин при постоянном мониторинге показателя преломления. После завершения гидрогенизации катализаторы отделяют фильтрацией и используют для следующей реакции.

Механизм гидрогенизации состоит из первоначального комплексообразования ненасыщенной жирной кислоты с катализатором, происходящего по каждому концу двойной связи (рис. 4.19, шаг 1). Водород, адсорбируемый катализатором, затем разрушает один из комплексов «углерод–металл» с образованием полугидрогенизированного состояния, при котором другой атом углерода остается связанным с катализатором (шаг 2). Чтобы завершить гидрогенизацию, этот полугидрогенизированный продукт взаимодействует с другим атомом водорода, что приводит к разрыву оставшейся связи «углерод–катализатор» и образованию гидрогенизированной жирной кислоты (шаг 3). Если водород недоступен, то может происходить обратная реакция, в ходе которой жирная кислота отщепляется от катализатора и двойная связь формируется снова (шаг 4). Вновь образовавшаяся двойная связь может быть в *цис-* или *транс*-конфигурации (геометрические изомеры), а также может находиться при тех же атомах углегода или мигрировать к соседнему атому (то есть жирная кислота с двойной связью, исходно расположенной между 9-м и 10-м атомами углерода может сместиться к 8-му и 9-му или к 10-му и 11-му атомам с образованием позиционных изомеров). Склонность к повторному образованию двойной связи зависит от концентрации водорода, связанного с катализатором. Высокое содержание геометрических и позиционных изомеров

бывает обусловлено низким давлением водорода, медленным перемешиванием, высокой температурой (скорость реакции превышает скорость диффузии водорода к катализатору) и высокой концентрацией катализатора (трудно насытить катализатор водородом). Высокое потребление *транс*-изомеров жирных кислот может увеличить риск сердечно-сосудистых заболеваний.

Гидрогенизация зачастую проходит избирательно и последовательно. Скорость гидрогенизации полиненасыщенных жирных кислот выше, чем у мононенасыщенных, что частично обусловлено более высоким сродством катализатора к пентадиеновым системам двойных связей полиненасыщенных жирных кислот, чем к мононенасыщенным жирным кислотам. Преимущественная гидрогенизация наиболее ненасыщенной жирной кислоты чаще доминирует в том случае, когда низка концентрация водорода в катализаторе. С точки зрения стабильности зачастую сначала необходима гидрогенизация наиболее ненасыщенных жирных кислот, поскольку тем самым повышается стойкость масла к окислению. При этом образуется минимальное количество высокоплавких насыщенных триацилглицеринов, которые могут вызывать проблемы с кристаллизацией и текстурой продуктов. Вместе с тем к повышенному образованию геометрических и позиционных изомеров жирных кислот могут привести и низкие концентрации водорода, в результате чего в жире будут высокое содержание *транс*-изомеров жирных кислот, нежелательных с точки зрения здорового питания.

4.4.2.6. Переэтерификация

Переэтерификация — это процесс перестройки ацильных групп в триацилглицеринах. Как правило, это случайный процесс, приводящий к образованию триацилглицерина с параметрами, отличающимися от исходного липида, что приводит к существенным изменениям кривой плавления жиров без изменения их жирнокислотного состава [46]. Переэтерификация также влияет на процесс кристаллизации жира, поскольку затрудняется образование наиболее стабильных форм кристаллов жира (триклинной β-формы), так как состав ТАГ становится более гетерогенным. Переэтерификация осуществляется посредством ацидолиза, алкоголиза, глицеролиза и межмолекулярной переэтерификации. Обычно для изменения свойств пищевых жиров применяют межмолекулярную переэтерификацию, при которой для ускорения реакции широко используются натриевые алкилаты (например, этилат натрия) — они относительно дешевы и активны при низких температурах. Натуральным катализатором этой реакции является карбонильный анион диацилглицерина (рис. 4.20). Этот отрицательно заряженный диацилглицерин атакует слабоположительную карбонильную группу жирной кислоты ТАГ с образованием переходного комплекса. При межмолекулярной трансэтерификации этот переходный комплекс разлагается так, что жирная кислота переходит в диацилглицерины, а анион мигрирует на место перемещенной жирной кислоты. Процесс переэтерификации может происходить как с тем же самым (внутримолекулярная переэтерификации), так и другим триацилглицерином (межмолекулярная переэтерификация). В последнем случае в реакционной среде должно быть малое содержание воды, свободных жирных кислот и пероксидов, дезактивирующих катализатор. Случайная переэтерификация происходит при температурах 100–150 °С и завершается в течение 30–60 мин. Реакцию останавливают добавлением воды, инактивирующей катализатор.

Межмолекулярную переэтерификацию можно проводить на жировых смесях, в частности, жиров с высокой температурой плавления и масел с низкими температурами плавления. Если просто смешать эти два источника липидов, то их кривая плавления по мере постепенного увеличения температуры могла бы иметь прерывистую ступенчатую кривую содержания твердых ТАГ (см. рис. 4.9). В ходе межмолекулярной переэтерификации этих двух жиров будут образовываться новые ТАГ с сочетанием насыщенных, и ненасыщенных жирных кислот, постепенно плавящихся во всем диапазоне пластичности. Другая область применения заключается в переэтерификации жиров с очень гомогенным составом ТАГ в целях получения гетерогенных ТАГ с широким дипазоном пластичности и образованием наиболее стабильных орторомбических β'-форм кристаллов.

Межмолекулярная этерификация не всегда протекает случайным образом. В прямой межмолекулярной переэтерификации температура реакции поддерживается достаточно низкой для того, чтобы синтезировались высоконасыщенные ТАГ. Они кристаллизуются и удаляются из полученного в ходе реакции осадка. В результате образуется более ненасыщенная жидкая фаза и более насыщенная твердая фаза по сравнению с исходным жиром. Межмолекулярную этерификацию можно также осуществить с использованием ли-

паз в качестве катализаторов [47]. Их преимуществом является то, что они могут быть специфичны к различным стереоспецифическим положениям в ТАГ или к различным жирным кислотам, то есть структурированные ТАГ можно получить путем изменений в жирнокислотном составе или в типе ТАГ (то есть изменениями в позиции *sn*-2). После замены жирной кислоты и/или изменения жирнокислотного состава ТАГ эти жиры могут приобрести улучшенные пищевые или физические свойства. К сожалению, ферментативная межмолекулярная переэтерификация — процесс довольно дорогой, и ее используют только для получения таких дорогих продуктов, как заменители масла какао и жиры, используемые в смесях для детского питания.

4.5. Роль триацилглицеринов в пищевых продуктах

Возможности ученых в области питания по улучшению качества пищевых продуктов зависят от глубины понимания ими той разнообразной роли, которые жиры и масла играют в свойствах готовых продуктов. Этот раздел посвящен в первую очередь наиболее важным функциям, которые играют жиры в формировании текстуры, внешнего вида, вкуса и аромата, а для подчеркивания наиболее важных аспектов в роли триацилглицеринов мы приведем конкретные примеры.

4.5.1. Текстура

Влияние жиров на текстуру пищевых продуктов определяется прежде всего физическим состоянием жира и природой пищевого матрикса (например, бестарный, основной, расфасованный жидкий жир, эмульгированный или структурный жир). У жидких жиров типа кулинарного жира или салатного растительного масла текстура определяется в основном вязкостью в определенном диапазоне температур, характерном для использования этих жиров. Для частично кристаллизованных жиров (в шоколаде, хлебобулочных и мучных кондитерских изделиях, в жирах, шортенингах, сливочном масле и маргарине) текстура в основном определяется содержанием, морфологией и взаимодействиями кристаллов жира [19, 23, 43]. Кривые плавления кристаллов жира играют большую роль в формировании таких свойств готовых продуктов, как текстура, стабильность, мажущиеся свойства и «ощущение во рту». Характерная кремообразная текстура многих пищевых эмульсий типа «масло-в-воде» (кремов, десертов, салатных заправок и майонеза) определяется присутствием жировых глобул. В этих системах вязкость в целом

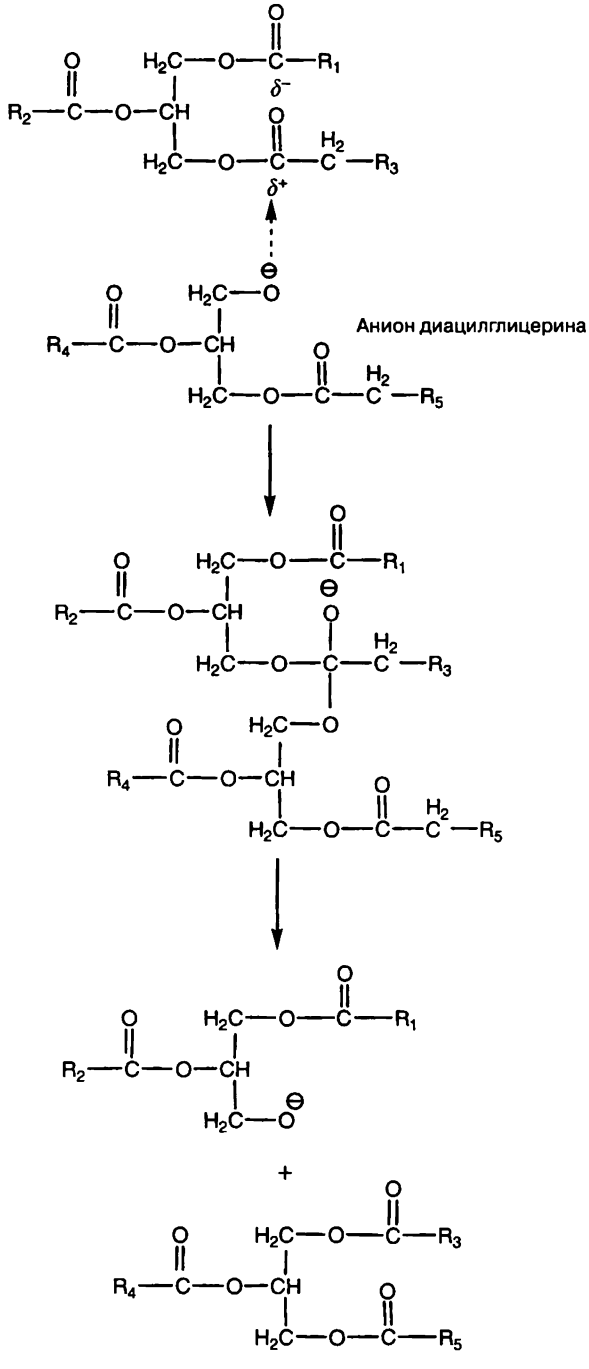


Рис. 4.20. Предложенный механизм реакции переэтерификации с использованием в качестве катализатора карбонильных анионов диацилглицерина. По [46]

определяется больше концентрацией присутствующих жировых глобул, чем вязкостью жира в этих глобулах [33]. Например, цельное молоко жирностью около 4% имеет относительно низкую вязкость, густые сливки жирностью около 40% более вязкие, а майонез (содержание жира около 80%) вообще вязкопластичен («полутвердый»), даже если вязкость жировой фазы в глобулах во всех этих продуктах примерно одинакова. В пищевых эмульсиях типа «вода-в-масле» общие реологические свойства системы определяется главным образом реологическими свойствами жировой фазы. В большинстве пищевых эмульсий типа «вода-в-масле» (в маргарине, сливочном масле и спредах) жировая фаза частично кристаллизована и характеризуется псевдопластическими свойствами. Реологические свойства этих продуктов, следовательно, определяются содержанием общего твердого жира (твердых триглицеридов), а также морфологией и взаимодействиями присутствующих кристаллов жира, характеристики которых, в свою очередь, зависят от условий кристаллизации и хранения (об этом см. далее). Например, мажущиеся свойства этих продуктов определяются формированием трехмерной сети из агрегатов жировых кристаллов в объеме непрерывной фазы, что придает продукту механическую твердость [31, 48]. Во многих пищевых продуктах жиры образуют существенную часть твердого матрикса, в которой содержатся и многие другие компоненты (ср., например, шоколад, торты и пирожные, печенье, бисквит, сыр). Физическое состояние жиров в этих системах существенно влияет на их текстуру за счет формирования сети взаимодействующих жировых кристаллов, что придает готовому продукту желаемые реологические свойства, в частности, твердость и хрусткость. Присутствие жировой фазы в этих продуктах влияет на текстуру и другими путями. Ниже мы рассмотрим несколько примеров продуктов, в текстуре которых жиры играют главную роль.

Хорошим примером важности кристаллизации жиров и их влияния на общую текстуру готового продукта является производство маргарина. Сначала необходимо выбрать жировую фазу со смесью триацилглицеринов, обладающую нужными для готового продукта зависимостью «ТТГ—температура» и морфологией кристаллов. Для формирования эмульсии «масло-в-воде» эту жировую фазу гомогенизируют (в жидком состоянии) с водной фазой, после чего полученную эмульсию обрабатывают в тщательно контролируемых (по критериям «время—температура—деформация сдвига») условиях. Этот контроль необходим для получения требуемых степени кристаллизации, размера кристаллов, полиморфной формы и степени взаимодействия кристаллов [38]. В идеале готовый продукт должен содержать трехмерную сеть мелких агрегатов кристаллов в β′-форме, так как это обеспечит требуемые характеристики текстуры и стабильности. В производстве маргарина эмульсию «масло-в-воде» обычно пропускают через скребковый теплообменник и кристаллизатор. В скребковом теплообменнике эмульсию быстро охлаждают и подвергают большим градиентам скорости сдвига, что вызывает быстрое формирование в жировой фазе кристаллов жира. Кристаллический жир в жировых глобулах стимулирует превращение эмульсии «масло-в-воде» в эмульсию «вода-в-масле» благодаря частичной коалесценции [23]. Эмульсия «вода-в-масле» состоит из капель воды, включенных в жировую фазу из скопления агрегированных кристаллов. Кристаллы жира образуются сначала в α-форме, постепенно превращаясь в более стабильную β′-форму. В процессе производства важно контролировать степень этого преобразования, поскольку она определяет количество и силу связей между кристаллами жира и тем самым — реологические свойства готового продукта. С другой стороны, важно предотвратить полиморфный переход при хранении из β′-формы в более стабильную β-форму, поскольку это приводит к формированию слишком крупных кристаллов (размером более 30 мкм), которые воспринимаются во рту как «крупинки» или «песчинки». Этот полиморфный переход иногда можно предотвратить путем добавления ПАВ [1], подбором жиров, не образующих β-формы, или смешиванием жиров, что благоприятствует их кристаллизации в нужную β′-форму.

Еще один пример важности влияния кристаллизации жира на текстуру пищевых продуктов — это разрыхлители (шортенинги). Разрыхлители — это особые жиры, используемые для обеспечения требуемых технологических свойств многих пищевых продуктов (кексов, хлебобулочных и мучных кондитерских изделий, жареных и выпечных изделий) [43]. К таким технологическим свойствам относят мягкость, текстуру, «ощущение во рту», структурную целостность, смазочные свойства, аэрируемость, теплопроводность и увеличение срока годности. В основе этих свойств лежат различные физико-химические механизмы. Разрыхлителями подобные ингредиенты называют потому, что они способствуют предотвращению взаимодействий между белками и крахмалом, придающим продукту мягкую консистенцию [43]. В других продуктах разрыхлители обеспечивают текстурные свойства за счет своей способности формировать трехмер-

ную сеть жировых кристаллов. Для получения желаемых технологических свойств отдельного продукта необходимо правильно подобрать смесь жиров и масел с подходящими кривой плавления и полиморфными характеристиками. Затем нужно получить нужный жир в условиях контролируемых охлаждения и сдвига, что позволит сформировать кристаллы требуемого типа и структуры [43]. Важно, чтобы при температуре хранения для сохранения их структуры жиры были частично кристаллизованными, но при потреблении они должны таять с формированием желаемого «ощущения во рту».

4.5.2. Внешний вид

Наличие жиров оказывает существенное влияние на внешний вид многих пищевых продуктов. Цвет жидких жиров (например, жарочных или салатных) в основном определяется примесями поглощающих свет пигментов, в частности, хлорофилла и каротиноидов. Твердые жиры обычно оптически непрозрачны из-за рассеяния света, обусловленного присутствием кристаллов жира, тогда как жидкие жиры обычно оптически прозрачны. Мутность жира зависит от концентрации, размера и формы присутствующих кристаллов жира. Непрозрачный, мутный или матовый внешний вид пищевых эмульсий — это следствие несмешиваемости масляной и водной фаз, приводящей к образованию системы, где капли одной фазы диспергированы в другой фазе. Пищевые эмульсии обычно оптически непрозрачны, поскольку свет, проходящий через них, на глобулах жира рассеивается [49]. Интенсивность рассеяния зависит от концентрации, размера и показателя рефракции присутствующих жировых глобул, так что и цвет, и мутность пищевых эмульсий обусловлены содержанием твердой жировой фазы. Например, цельное молоко (жирностью около 4%) «белее», чем обезжиренное (жирность менее 0,1%) потому, что в нем содержатся глобулы молочного жира, сильно рассеивающие свет, тогда как обезжиренное молоко содержит только мицеллы казеина, рассеивающие свет намного слабее.

Одним из примеров влияния кристаллизации жира на внешний вид пищевых продуктов может служить белый налет, являющийся по сути дефектом качества шоколада или глазури [50]. Этот белый налет проявляется в виде крупных белых пятен на поверхности продукта или слабого белесовато-серого налета. Для объяснения его появления в различных продуктах предлагаются разные механизмы, но все они связаны с проблемами стабильности кристаллов жира (например, из-за недостаточного темперирования, несовместимости жиров в смесях, миграции и рекристаллизации жиров). Физико-химическая основы этих различных механизмов возникновения жирового поседения рассмотрены в работе [50]. Такой белый налет является дефектом некоторых шоколадных продуктов, подвергающихся в процессе хранения температурным перепадам, поскольку именно изменение температуры является причиной плавления жировой фазы и рекристаллизации [1]. Было высказано предположение, что кристаллы жира на поверхности изменяют свою морфологию, и из плоских гладких кристаллов, зеркально отражающих свет и придающих изделию блеск, образуются заостренные кристаллы, больше рассеивающие свет и придающие поверхности изделия матовость. Появление белого налета зачастую можно замедлить или предотвратить с помощью ПАВ, препятствующих изменению полиморфных форм кристаллов жира, а также путем тщательного контроля температуры хранения [1].

4.5.3. Вкус и аромат

Триацилглицерины — это относительно крупные молекулы, обладающие слабыми летучими свойствами и, соответственно, слабым собственным вкусом и запахом. Тем не менее, пищевые жиры и масла из различных натуральных источников обладают собственным вкусом из-за присутствия в них характерных летучих соединений — продуктов окисления липидов и примесей. Их минорные жирнокислотные компоненты также придают слабые вкусовые оттенки, особенно в животных жирах (см. главу 10). На вкус и аромат многих пищевых продуктов опосредованно влияет и собственно жировая фаза, поскольку вкусоароматические вещества могут распределяться между жировой, водной и газообразной фазами внутри пищевого матрикса в зависимости от их полярности и летучих свойств [33]. На воспринимаемый вкус и аромат пищи тем самым сущест венно влияет тип и концентрация присутствующих жиров.

Жир многих пищевых продуктов обусловливает «ощущение во рту» [23]. Жидкие жиры в ходе пережевывания могут обволакивать язык, обеспечивая характерное «масляное» ощущение. Кристаллы жира

делают такое ощущение «зернистым» или «песчанистым», особенно если они достаточно крупные, а если они мелкие, то создается ощущение «гладкости» или «сливочности» [38]. Таяние кристаллов жира на языке вызывает освежающее ощущение («холодок»), являющееся важным органолептическим свойством многих жиросодержащих продуктов [22].

4.6. Химическое разложение жиров. Гидролитические реакции

Присутствие в пищевых продуктах свободных жирных кислот может проявляться в образовании побочных привкусов, снижении стойкости к окислению, в пенообразовании и снижении температуры дымообразования. Если высвобождение из глицерина свободных жирных кислот приводит к образованию соединений с посторонним привкусом (например, летучих свободных низкомолекулярных кислот, образующих посторонние запахи, или высокомолекулярных жирных кислот, придающих продукту мыльный привкус), то такое явление называют *гидролитическим прогорканием*. Вместе с тем свободные низкомолекулярные жирные кислоты в некоторых продуктах типа сыров иногда желательны, поскольку они участвуют в создании характерного вкусоароматического профиля продукта.

Свободные жирные кислоты могут высвобождаться из триацилглицеринов ферментами, называемыми липазами. В живых тканях активность (фосфо)липаз жестко регулируется, поскольку жирные кислоты могут быть цитотоксичными из-за своей способности к разрушению целостности клеточных мембран. При обработке и хранении биологических тканей, используемых в качестве сырья для производства пищевых продуктов, клеточные структуры и механизмы биологического регулирования могут нарушиться, и липазы активизируются (например, входят в контакт с жировыми субстратами). Хорошим примером здесь может служить производство оливкового масла. После первого отжима концентрация в нем свободных жирных кислот невелика, а в масле последующих отжимов и масле, отпресованном из жмыха, их концентрации выше (вследствие того, что клеточный матрикс уже разрушен и липазы приняли участие в гидролизе триацилглицеринов). Гидролиз ТАГ протекает также в жарочных жирах вследствие действия высоких температур и влаги из подвергаемых жарке пищевых продуктов. Как только содержание свободных жирных кислот возрастает, температура дымообразования и стойкость к окислению понижаются, а способность к пенообразованию увеличивается. Для увеличения срока хранения выпускаемые промышленностью жарочные жиры фильтруют с адсорбентами, способными связывать и удалять свободные жирные кислоты. Гидролиз триацилглицеринов происходит также при экстремальных значениях pH.

4.7. Химическая порча жиров. Окислительные реакции

Термином «окисление липидов» обозначают целый комплекс последствий химических изменений, которые являются результатом взаимодействия липидов (жиров) с кислородом [51, 52]. Триацилглицерины и фосфолипиды обладают низкой летучестью и поэтому опосредованно влияют на вкус и аромат пищевых продуктов. В ходе реакции окисления липидов жирные кислоты, этерифицированные до триацилгицеринов и фосфолипидов, разлагаются с образованием небольших летучих молекул. Эти молекулы являются источником неприятного запаха, обусловленного *окислительным прогорканием*. Как правило, эти летучие соединения обусловливают снижение качества продуктов, хотя существуют некоторые продукты (жареные продукты, сухие зерновые завтраки и сыры), для которых небольшое содержание продуктов окисления липидов необходимо для улучшения их вкусоароматического профиля.

4.7.1. Механизмы окисления липидов

В реакциях окисления липидов центральное место занимают молекулярные частицы, называемые свободными радикалами. Они представляют собой молекулы или атомы, имеющие в структуре неспаренные электроны. Эти свободные радикалы значительно различаются по своей энергии. Например, гидроксильный радикал ($^{\cdot}OH$) обладает очень высокой энергией и может окислить почти любую молекулу путем отрыва от нее атома водорода, тогда как антиоксидант α-токоферол может образовывать свободные радикалы, обладающие очень низкой энергией и менее способные атаковать молекулы (например, ненасыщенных жирных кислот).

Кинетика окисления липидов в пищевых продуктах зачастую характеризуется некоторой фазой задержки (лаг-фазой), после которой начинается экспоненциальное увеличение скорости окисления (рис. 4.21). Продолжительность этой лаг-фазы очень важна для переработчиков пищевых продуктов, так как в это время прогорклость еще не обнаруживается, и качество пищевых продуктов остается высоким. С началом фазы экспоненциального увеличения скорости окисления липиды весьма быстро окисляются с ускоренным образованием побочных вкусоароматических соединений. Продолжительность лаг-фазы возрастает с понижением температуры, содержания кислорода, степени ненасыщенности жирных кислот, активности прооксидантов и увеличением содержания антиоксидантов. Увеличение продолжительности лаг-фазы при окислении эмульсии курурузного масла в воде с помощью гамма-токоферола показано на рис. 4.21 [53].

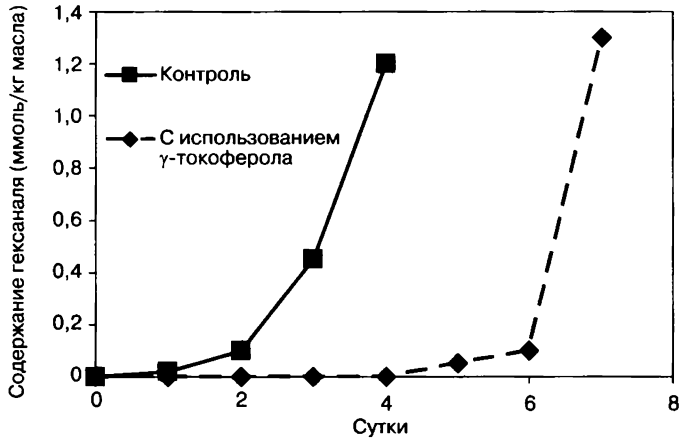


Рис. 4.21. Влияние γ-токоферола на лаг-фазу окисления эмульсии кукурузного масла в воде. По [53]

Окисляться могут как свободные жирные кислоты, так и ацильные группы. Окисление жирных кислот можно разделить на три основные стадии — инициирования, развития и окончания окисления.

На стадии *инициирования окисления* происходит отрыв атома водорода от молекулы жирной кислоты с образованием жирнокислотного радикала (алкил-радикала, L$^{\cdot}$). После его образования происходит стабилизация свободного радикала за счет его делокализации по двойной связи или связям, что в итоге приводит к смещению двойной связи. В случае полиненасыщенных жирных кислот эта стабилизация осуществляется путем формирования коньюгированных двойных связей. Такое смещение может продуцировать двойные связи как в *цис*-, так и в *транс*-конфигурации с преобладанием *транс*-конфигугации за счет ее большей стабильностии. Стадия инициирования, заключающаяся в отщеплении атома водорода от ограниченного метиленовыми фрагментами атома углерода линолевой кислоты, показана на рис. 4.22. Параллельная перегруппировка двойных связей приводит к образованию двух изомеров. При отщеплении атома водорода от олеиновой кислоты алкильный радикал может существовать в четырех различных положениях (рис. 4.23).

С увеличением степени ненасыщенности возрастает легкость образования жирнокислотных радикалов. Энергия диссоциации ковалентной связи «углерод–водород» и алифатической цепи составляет 98 ккал/моль. Если атом углерода является смежным с богатой электронами двойной связью, то ковалентная связь «углерод–водород» ослабевает, и энергия диссоциации снижается до 89 ккал/

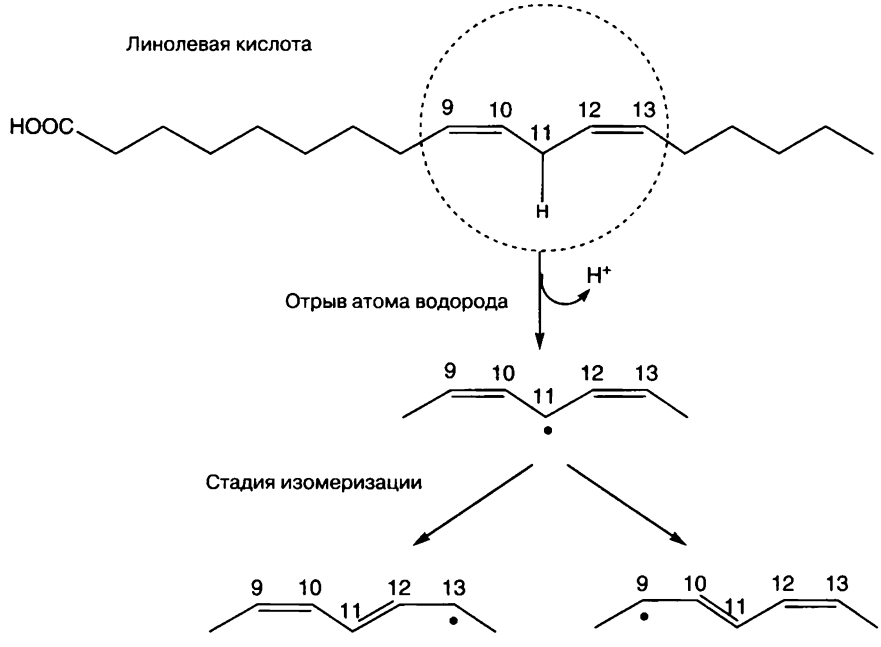


Рис. 4.22. Стадия инициирования окисления линолевой кислоты

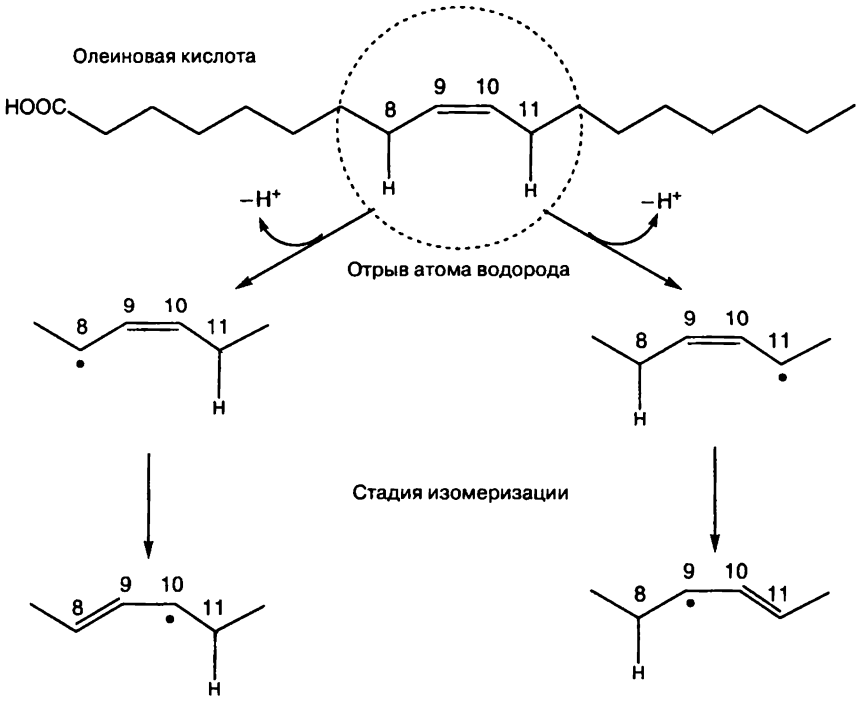


Рис. 4.23. Стадия инициирования окисления олеиновой кислоты

моль. В полиненасыщенных жирных кислотах двойные связи находятся в пентадиеновой конфигурации, причем один атом углерода ограничен с двух сторон метиленовыми фрагментами (рис. 4.24). Поскольку ковалентная связь «углерод–водород» в этом ограниченном метиленовыми фрагментами атоме углерода ослаблена двумя двойными связями, то ее энергия диссоциации еще ниже — 80 ккал/моль. С уменьшением энергии диссоциации связи «углерод–водород» отщепление атома водорода облегчается, и окисление липидов протекает быстрее. Показано, что линолевая кислота ($C_{18:2}$) в 10–40 раз чувствительнее к окислению, чем олеиновая ($C_{18:1}$). Когда в полиненасыщенных жирных кислотах образуются дополнительные двойные связи, то добавляются и дополнительные ограниченные метиленовыми фрагментами атомы углерода, из-за чего формируются новые возможные положения для отщепления атома водорода. Например, у линолевой кислоты ($C_{18:2}$) один ограниченный метиленовыми фрагментами атом углерода, у линоленовой($C_{18:3}$) — два, а у арахидоновой кислоты ($C_{20:4}$) — три (рис. 4.24). В большинстве случаев скорость окисления с добавлением одного ограниченного метиленовыми группами атома углерода удваивается. Так, линоленовая кислота окисляется вдвое быстрее, чем линолевая, а арахидоновая — вдвое быстрее, чем линоленовая и в четыре раза быстрее, чем линолевая.

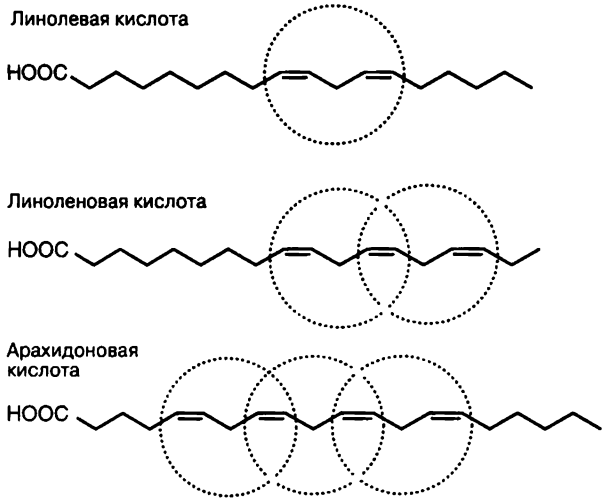


Рис. 4.24. Пентадиены линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот

Стадия развития окисления. Первая фаза этой стадии — это добавление к алкильному радикалу атома кислорода. Атмосферный или триплетный кислород является бирадикальным, поскольку в нем присутствуют два электрона с одинаковым направлением спина, не способные сосуществовать на одной спиновой орбитали. Свободные радикалы триплетного кислорода обладают низкой энергией и не могут непосредственно вызвать отщепление атома водорода. Вместе с тем свободные радикалы кислорода могут реагировать с алкильными радикалами со скоростью, ограниченной диффузионными факторами. Комбинация алкильного радикала с одним из радикалов триплетного кислорода приводит к образованию ковалентой связи. Другой радикал кислорода остается свободным. Образующийся радикал известен как пероксидный радикал (LOO·). Высокая энергия пероксидных радикалов позволяет им быть промоторами отщепления атома водорода от другой молекулы.

Поскольку ковалентные связи «углерод–водород» в ненасыщенных жирных кислотах слабы, то они весьма чувствительны к образованию гидропероксида жирной кислоты и формированию нового алкильного радикала у другой жирной кислоты. Тем самым реакция окисления распространяется от одной молекулы жирной кислоты к другой (схематически этот путь на примере двух молекул линолевой кислоты показан на рис. 4.25). Локализация липидного гидропероксида коррелирует с локализацией алкильных радикалов (см. рис. 4.22 и 4.23). Так, из олеатов получаются четыре гидропероксида, а из линолеатов — два.

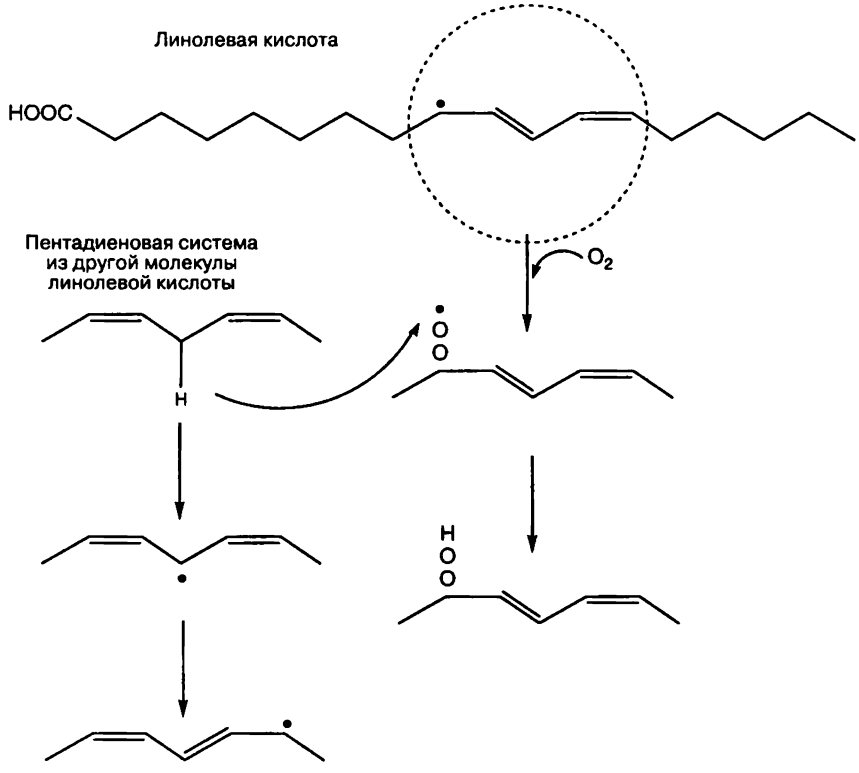


Рис. 4.25. Стадия развития окисления липидов на примере линолевой кислоты

Стадия окончания окисления. На этой стадии из комбинации двух радикалов образуются нерадикальные частицы. В присутствии кислорода преобладающим свободным радикалом является пероксидный, поскольку кислород присоединяется к алкильным радикалам со скоростью, ограниченной, как мы уже отмечали, диффузионными лимитирующими факторами. Таким образом, при атмосферных условиях реакции окисления на заключительной стадии протекают между пероксидным и алкоксильным радикалами. При низком содержании кислорода в среде (например, в жарочных жирах) реакции окончания окисления могут происходить только между алкильными радикалами с образованием димеров жирных кислот (рис. 4.26). Полимеры жирных кислот используются в качестве индикаторов качества жарочных жиров [45].

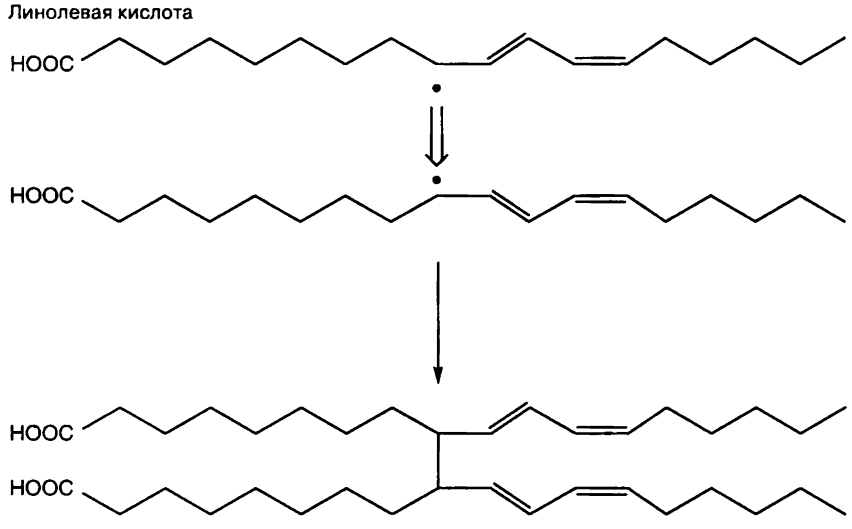


Рис. 4.26. Пример стадии окончания реакции окисления жиров в условиях низкого содержания кислорода

4.7.2. Прооксиданты

Окисление липидов зачастую происходит как автоокисление, где префикс «авто-» означает «самопроизвольное», то есть понятие «автоокисление» используется для описания самопроизвольного образования свободных радикалов в присутствии кислорода из ненасыщенных жирных кислот в ходе

окисления липидов. На стадии инициирования отрыв атома водорода от молекул ненасыщенных жирных кислот приводит к образованию одного свободного радикала. Присоединение кислорода к алкильному радикалу с образованием пероксидного радикала и последующее отщепление атома водорода от другой молекулы жирной кислоты или антиоксиданта с образованием липидного гидропероксида на стадии развития окисления не приводят к увеличению общего количества свободных радикалов. Так, если в процессе окисления липидов «автоокисление» было бы единственной реакцией, то образование продуктов окисления нарастало бы линейно (начиная с некоторого нулевого момента времени), однако в большинстве пищевых продуктов после лаг-фазы следует быстрое экспоненциальное увеличение содержания продуктов окисления. Это свидетельствует о том, что существуют другие реации окисления липидов, при которых образуются дополнительные свободные радикалы.

Прооксиданты, встречающиеся практически в любых пищевых системах, представляют собой соединения или факторы, которые инициируют или ускоряют окисление жиров. Многие прооксиданты не являются истинными катализаторами, поскольку по ходу реакции они изменяются (например, синглетный кислород превращается в гидропероксид, а ион железа переходит в окисленное состояние). Прооксиданты могут ускорять окисление липидов либо благодаря прямым взаимодействиям с ненасыщенными жирными кислотами с образованием гидропероксидов (например, *LOX* или синглетный кислород), либо путем стимулирования образования свободных радикалов (например, разложение гидропероксида, активированное переходным металлом или УФ-излучением). Следует отметить, что липидные гидропероксиды не участвуют в образовании неприятных привкусов и запахов и, таким образом, они вызывают прогоркание не прямо, а опосредованно. Вместе с тем гидропероксиды являются важными субстратами для прогоркания, поскольку их распад зачастую приводит к расщеплению жирных кислот с образованием низкомолекулярных летучих соединений с неприятным привкусом и запахом. Далее мы рассмотрим основные прооксиданты пищевых продуктов.

4.7.2.1. Стимулирование образования гидропероксидов

Синглетный кислород. Как мы уже отмечали, триплетный кислород ($^3O_2$) является бирадикальным, поскольку два его электрона находятся на несвязывающей 2*p*-орбитали и имеют одинаковый (параллельный или антипараллельный) спин (рис. 4.27). Принцип запрета Паули гласит, что два электрона с одинаковым спином не могут существовать на одной и той же электронной орбитали. Если электроны на несвязывающей 2*p*-орбитали имеют противоположные спиновые направления, то кислород называют синглетным ($^1O_2$). Он может существовать в пяти различных конфигурациях, причем в пищевых продуктах наиболее широко распространено $^1\Delta$- состояние, когда электроны существуют в одной и той же орбитали (подробнее об этом см. работу [51]). Поскольку синглетный кислород более электрофилен, чем триплетный, то он может непосредственно реагировать с двойной связью, обладающей высокой электронной плотностью. Когда электроны в синглетном кислороде соответствуют по спину электронам двойной связи, они могут реагировать с ненасыщенными жирными кислотами с непосредственным образованием липидных гидропероксидов, причем в 1500 раз быстрее, чем в случае триплетного кислорода. Синглетный кислород может реагировать с любым атомом углерода на конце двойной связи. В результате такого взаимодействия двойная связь смещается и образуется *транс*-двойная связь. Это означает, что при окислении линолеата синглетным кислородом может образовываться четыре различных гидропероксида (рис. 4.27), а не два, как на стадии инициирования окисления (см. рис. 4.22). Эти различия в локализации гидропероксидной группы дают различные продуктов разложения жирных кислот (см. далее).

Чаще всего синглетный кислород образуется в результате фотосенсибилизации. Светочувствительными компонентами пищевых продуктов являются хлорофилл, рибофлавин и миоглобин, которые могут поглощать энергию света с образованием возбужденного синглетного состояния, которое затем превращается в возбужденнное триплетное. В возбужденном триплетном состоянии они могут вступать в реакцию непосредственно с такими субстратами, как ненасыщенные жирные кислоты, и отрывать от них атом водорода, вызывая инициирование окисления липидов. Этот путь называют «тип 1», и в этом случае продуцируются такие же липидные гидропероксиды, как и на этапе инициирования окисления (см. рис. 4.22). На пути «типа II» светочувствительный компонент в возбужденном триплетном состоянии может реагировать с триплетным кислородом с образованием синглетного кислорода и синглетного состояния фотосенсиби-

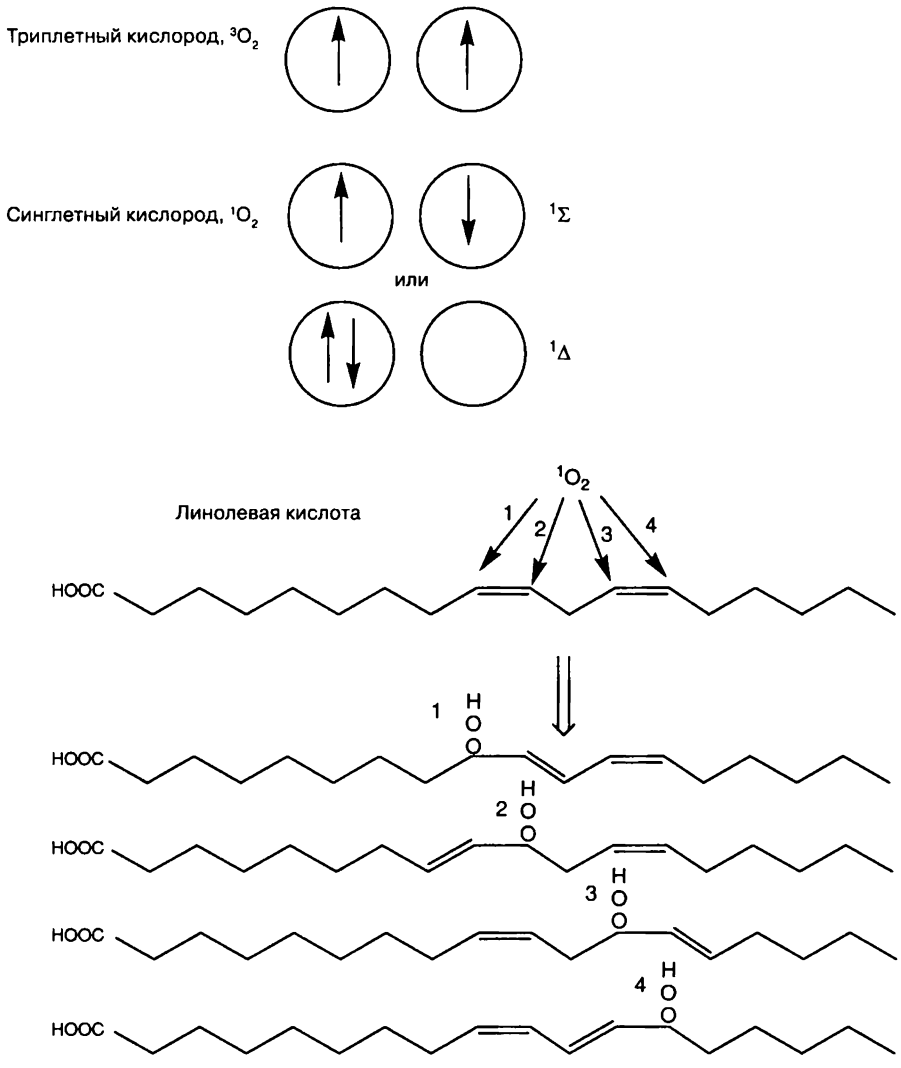


Рис. 4.27. Синглетный кислород и активированное им образование гидропероксида линолевой кислоты. По [51]

лизатора. Реакции у типов I и II зависят от содержания кислорода, причем при высоком его содержании в окружающей среде доминирует «тип II». Синглетный кислород можно получать также химически, ферментативно и путем разложения гидропероксидов, однако его образование путем фотосенсибилизации считается основным путем появления синглетного кислорода в пищевых продуктах.

Липоксигеназа. В растительных и животных тканях присутствуют ферменты, называемые *LOX* и продуцирующие гидропероксиды липидов. *LOX* из соевых бобов и гороха присутствует в виде отдельных изоформ (см. работу [55]). В соевых бобах изоформа *L*-1 реагирует преимущественно со свободными жирными кислотами и в линолевой и линоленовой кислотах она образует гидропероксиды при 13 атоме углерода. Изоформа *L*-2 образует гидропероксиды в положениях 9 и 13, причем действует она как на свободные, так и на этерифицированные линолевую и линоленовую кислоты. Растительные *LOX* являются цитоплазматическими ферментами с негемовым железом. Железо в неактивных *LOX* находится в двухвалентном состоянии (рис. 4.28, 1). Активация происходит за счет окисления железа до трехвалентного состояния, обычно активируемого пероксидом (2). Затем *LOX* катализирует отщепление атома водорода от окруженного метиленовыми фрагментами атома углерода с формированием алкильного радикала и преобразо-

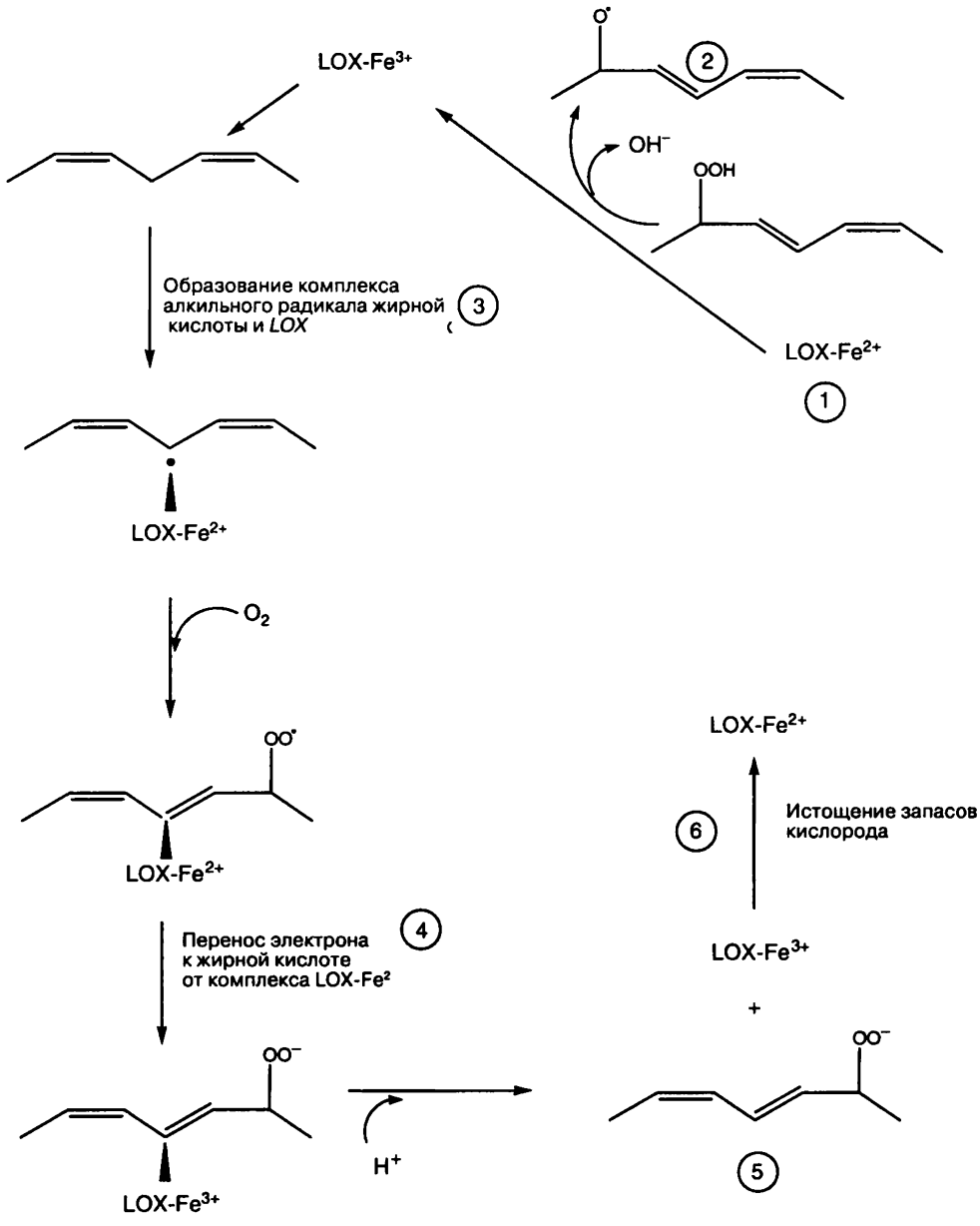


Рис. 4.28. Механизм образования гидропероксида линолевой кислоты, активируемого *LOX*. По [55]

ванием железа *LOX* обратно в двухвалентное состояние. В результате образуется комплекс алкильного радикала жирной кислоты с *LOX* (3). Электрон из иона железа затем передается пероксидному радикалу с образованием пероксидного аниона (4). При реакции последнего с водородом и образовании гидропероксида жирная кислота отщепляется от фермента (5). Если запасы кислорода в системе истощаются, то фермент отщепляет атом водорода от жирной кислоты, и железо переходит в двухвалентное состояние (6). При полном отсутствии кислорода отщепляется алкильный радикал, и *LOX* возвращается в свою неактивную форму. Существуют данные о присутствии *LOX* в животных тканях, особенно в тканях, непосредственно связаных с деятельностью сердечно-сосудистой системы (например, в жабрах рыб) [56].

4.7.2.2. Стимулирование образования свободных радикалов

Ионизирующее излучение. В целях уничтожения патогенных микроорганизмов и увеличения срока годности пищевые продукты иногда подвергают действию ионизирующего излучения, однако оно может перевести молекулы в возбужденные состояния с образованием свободных радикалов. В ходе ионизирующего облучения из воды образуются гидроксильные радикалы ($^{\cdot}OH$), которые являются наиболее реакционноспособными из известных радикалов, причем настолько активными, что способны отделять от липидов водород, а также молекулы белков и ДНК. Не удивительно, что облучение пищевых продуктов, особенно из мышечных тканей с высоким содержанием жиров и прооксидантов, может усилить их окислительное прогоркание.

4.7.2.3. Стимулирование разложения гидропероксидов

Гидропероксиды липидов присутствуют практически во всех жиросодержащих пищевых продуктах. Пероксид водорода также присутствует в пищевых продуктах при использовании его в виде технологической добавки и при продуцировании его такими ферментами, как, например, супероксиддисмутаза (*SOD*). В триацилглицеринах пищевых продуктов обычно содержится от 1 до 100 нмоль липидных гидропероксидов на 1 г липида, что в 400–1000 раз больше, чем прогнозируемые концентрации липидных гидропероксидов *in vivo* (например, липидов плазмы). Это заставляет предположить, что при экстракции и рафинировании жиров и масел происходит окисление [57]. Липидные гидропероксиды под действием высоких температур термообработки или прооксидантов могут разлагаться с образованием дополнительных радикалов, что может приводить к экспоненциальному усилению окислительных процессов, заметных во многих пищевых продуктах после окончания лаг-фазы и стадии инициирования окисления. Разложение липидных гидропероксидов также приводит к образованию алкоксильных радикалов, способных вступать в реакции β-расщепления (реакции β-расщепления — это основной путь разложения жирных кислот на такие низкомолекулярные соединения, которые достаточно летучи для ощущения окислительной прогорклости, см. об этом далее).

Переходные металлы. Переходные металлы присутствуют во всех пищевых продуктах, поскольку они распространены в биологических и упаковочных материалах, воде и ингредиентах. Эти металлы являются основными прооксидантами и снижают стойкость продуктов и биологических тканей к окислению из-за своей способности разлагать гидропероксиды на свободные радикалы [58, 59]. Эти реакционноспособные металлы разделяют водород и липидные пероксиды по следующему окислительно-восстановительному циклу:

$$Mn^{n+} + LOOH \text{ или } HOOH \rightarrow Mn^{n+1} + LO^{\cdot} \text{ или } HO^{\cdot} + OH^{-} \quad (4.7)$$

$$Mn^{n+1} + LOOH \rightarrow Mn^{n+} + LOO^{\cdot} + H^{+} \quad (4.8)$$

Mn^{n+} и Mn^{n+1} — это переходные металлы в восстановленном и окисленном состояниях, LOOH и HOOH — соответственно, пероксиды липидов и водорода, а $LO^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$ и $LOO^{\cdot}$ — алкоксильный, гидроксильный и пероксильный радикалы. Гидроксильный радикал образуется из пероксида водорода, а алкоксильные образуются из липидных гидропероксидов. Когда в этом цикле участвуют железо и гидропероксид, то его называют реакцией Фентона. На скорость разложения гидропероксида влияют концентрация, химическое состояние и тип металла. Наиболее распространенными переходными металлами в пищевых продуктах, участвующими в этих реакциях, являются медь и железо, причем железо обычно присутствует в больших концентрациях, чем медь. Медь наиболее реакционноспособна в одновалентном состоянии (Cu^{1+}), разлагая пероксид водорода в 50 раз быстрее, чем ионы двухвалентного железа (Fe^{2+}). Важна также степень окисления, поскольку Fe^{2+} расщепляет пероксид водорода более чем 10^5 раз быстрее, чем Fe^{3+} В пищевых продуктах на основе воды ионы Fe^{2+} более доступны для ускорения разложения гидропероксида. Свою роль играет и тип пероксида — гипероксиды липидов разлагаются Fe^{2+} примерно в 10 раз быстрее, чем пероксид водорода [58, 59].

Поскольку переходные металлы в восстановленном состоянии сильнее влияют на разложение гипероксидов, восстановители, способные стимулировать окислительно-восстановительный цикл переходных металлов, могут активировать окисление липидов. К примерам таких восстановителей можно отне-

сти супероксид-анион ($^{\cdot}O_2^-$) и аскорбиновую кислоту. Супероксид-анион образуется путем добавления электрона к триплетному кислороду. Электрон в супероксид-анионе затем передается переходному металлу, вызывая его восстановление. Супероксид-анион продуцируется ферментами, а также при выделении кислорода из оксимиоглобина с образованием метмиоглобина, или он продуцируется такими клетками, как фагоциты. Окислительно-восстановительный цикл железа с участием аниона супероксида, необходимого для активирования окисления липидов, известный как реакция Габера–Вайсса, приведен ниже.

$$Fe^{3+} + {}^{\cdot}O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \quad (4.9)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^- \quad (4.10)$$

$$\text{Итого: } {}^{\cdot}O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^- \quad (4.11)$$

В реакциях, подобных реакции Габера–Вайсса, может также принимать участие аскорбиновая кислота, однако, в отличие от супероксид-аниона, она может действовать и как антиоксидант. При высокой концентрации аскорбата его антиоксидантная активность доминирует над его способностью ускорять окисление, катализируемое металлом, что приводит к результирующему антиоксидантному эффекту.

Стимулировать разложение гидропероксида также могут переходные металлы, связанные с белками. Наиболее исследованными объектами из этой группы являются гемовые белки. Железо миоглобина, гемоглобина, пероксидаз и каталаз способно активировать разложение гидропероксидов перекисных соединений липидов. Было высказано предположение, что в некоторых случаях гемовые белки являются причиной гомолитического расщепления липидных гидропероксидов, то есть при разложении гидропероксида образуются два свободных радикала (гидро- и алкоксильный). Термическая денатурация этих белков может увеличить их прооксидантную активность преимущественно за счет повышения доступности гемового железа, которое более эффективно взаимодействует с гидропероксидами. Одним из факторов, ускоряющим окисление жиров в мясе после тепловой обработки, является денатурация миоглобина, связанная с образованием побочного так называемого «перегретого» привкуса.

Действие света и повышенных температур. Свет в УФ- и видимом диапазоне может стимулировать разложение гидропероксидов с образованием свободных радикалов. Так, светонепроницаемая упаковка может замедлить скорость окисления липидов. Гидропероксиды липидов могут также разлагаться под действием повышенных температур. Фактически, в прогорклом жарочном масле накопление гидропероксидов липидов зачастую не заметно, так как после своего образования гидропероксиды быстро разрушаются.

4.7.3. Образование продуктов окислительного разложения липидов

При разложении гидропероксидов липидов на алкоксильные радикалы может иметь место последовательность химических реакций. Образующиеся продукты этих реакций зависят от типа жирной кислоты, а также от положения в ней гидропероксидной группы. Кроме того, продукты разложения могут быть ненасыщенными и иметь неповрежденные пентадиеновые структуры, то есть быть подверженными окислению. Это приводит к появлению сотен различных продуктов разложения жирных кислот. Поскольку тип продуктов разложения жирной кислоты зависит от жирнокислотного состава пищевого продукта, окисление липидов по-разному влияет на его органолептические свойства. Например, окисление растительных масел, имеющих в составе преимущественно ω-6 жирные кислоты, будет давать «травянистый» или «бобовый» побочные запахи, а окисление высокомолекулярных ω-3 жирных кислот рыбьего жира —«рыбные» запахи.

Одна из причин, по которой разложение гидропероксидов липидов заканчивается разрывом алифатической цепи жирных кислот, заключается в том, что при этом образуются алкоксильные радикалы ($LO^{\cdot}$). Алкоксильный радикал обладает более высокой энергией, чем алкильный ($L^{\cdot}$) и пероксильный ($LOO^{\cdot}$) радикалы. Поэтому при образовании алкоксильного радикала у него достаточно энергии для отрыва электрона от соседних ковалентных связей с разрывом алифатической цепи жирной кислоты. Последняя реакция, известная как реакция β-расщепления, очень важна для качества пищевых продуктов, поскольку именно она является причиной разложения жирных кислот с образованием низкомолекулярных соединений, дающих ощущение прогорклости.

4.7.3.1. Реакции β-расщепления

Разложение гидропероксидов липидов с образованием алкоксильных радикалов ($LO^{\cdot}$) обычно сопровождается реакцией β-расщепления, которая разделяет алифатическую цепь жирной кислоты на части с образованием на алифатической цепи альдегидов и радикала (например, алкил-радикала). Алкил-радикал может затем вступать в реакцию с радикалом водорода, образуя углеводород, с гидроксильным радикалом, образуя спирт, или с кислородом, образуя гидропероксид. Примеры этих реакций приведены на рис. 4.29, а более детально с ними можно ознакомиться в других работах [см., например, 52]. Поскольку в цепях ненасыщенных жирных кислот существуют многочисленные позиции для образования гидроперкосида, в результате реакций β-расщепления образуется много разных продуктов. Для демонстрации типов продуктов, образующихся в результате реакций β-расщепления, используют неэтерифицированную линолевую кислоту. Следует помнить, что в реальных пищевых системах продукты разложения с того конца жирной кислоты, который несет карбоксильную группу, будут, как правило, этерифицированы до глицерина какого-то ТАГ или фосфолипида, то есть они будут нелетучими и не будут участвовать в образовании прогорклости (если, конечно, они не подвергнутся дальнейшим реакциям разложения с образованием низкомолекулярных соединений).

Образование продуктов разложения линолевой кислоты в том случае, если гидропероксид локализован на 9 атоме углерода, а β-расщепление происходит со стороны метильного конца молекулы, показано на рис. 4.30. На 1-й стадии гидропероксид разлагается с образованием алкоксильного радикала. Вторая стадия иллюстрирует реакцию β-расщепления, в ходе которой разделяются соседние углерод-углеродные связи с образованием двух продуктов реакции — 9-оксононаноата и винильного радикала на 9-м атоме углерода (олефинового радикала). Эти винильные радикалы зачастую взаимодействуют с гидроксильными радикалами с образованием альдегидов, давая, таким образом, 3-ноненаль. Аналогичные схемы синтеза также имеют место, если гидропероксид находится на 13-м атоме углерода. Расщепление молекулы

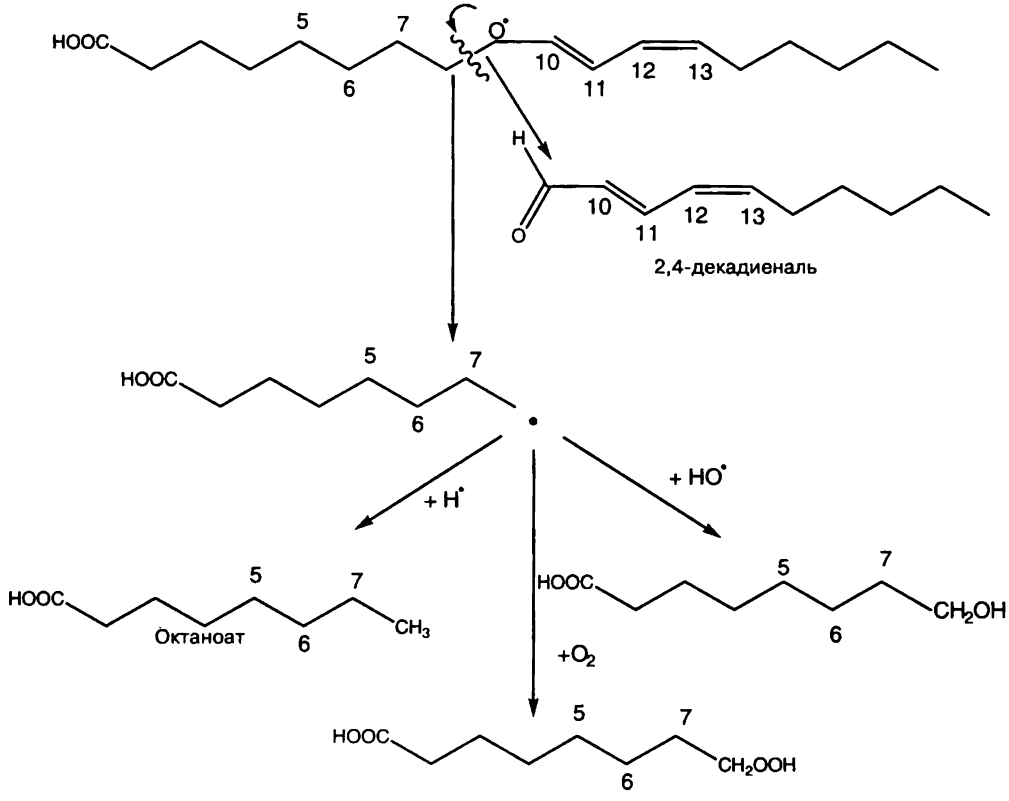


Рис. 4.29. Возможная схема реакции образования свободных радикалов липидов при реакции β-расщепления. По [52]

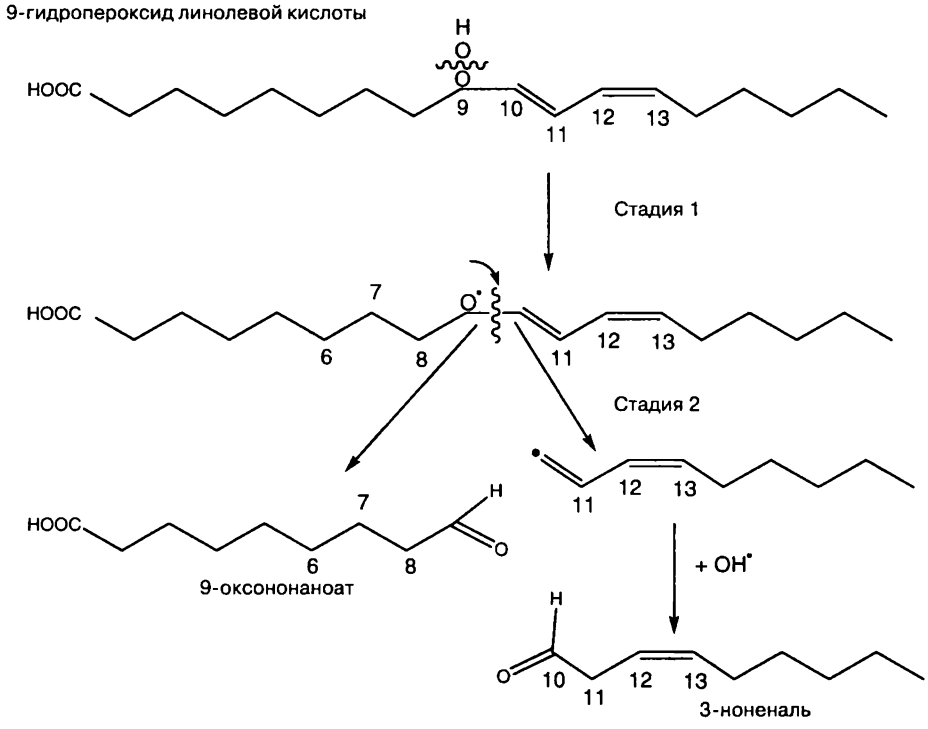


Рис. 4.30. Образование продуктов разложения в результате β-расщепления 9-гидропероксида линолевой кислоты, если расщепление жирной кислоты осуществляется со стороны метильного конца гидропероксида. По [52]

по концу с карбоксильной группой дает 12-оксо-9-додеценоат и гексаналь, а расщепление по метильному концу молекулы жирной кислоты дает 13-оксо-9,11-тридекадиеноат и пентан-9. Гидропероксид линолевой кислоты может подвергаться β-расщеплению и по карбоксильному концу жирной кислоты, когда после образования алкоксильного радикала (см. рис. 4.29) образуются октаноат и 2,4-декадиеналь.

Когда линолевую кислоту атакует синглетный кислород, гидропероксиды образуются при всех атомах углерода с двойными связями (см. рис. 4.27). Это означает, что гидропероксиды образуются и при 9-м и 13-м атомах углерода, как и в случае окисления, инициированного свободными радикалами; кроме того, образуются гидропероксиды при 10-м и 12-м атомах углерода. Типичными продуктами реакции β-расщепления алкоксильного радикала при 10-м атоме углерода являются 9-оксононаноат и 3-ноненаль при расщеплении со стороны карбоновой кислоты, и 10-оксо-8-деценоат и 2-октен при расщеплении с метильного конца жирной кислоты. Типичными продуктами реакции β-расщепления алкоксильного радикала при 12-м атоме углерода являются 9-ундеценоат и 2-гептеналь (при расщеплении по концу карбоновой кислоты), и 12-оксо-9-додеценоат и гексаналь (при расщеплении по метильному концу жирной кислоты).

Как следует из вышеприведенного списка продуктов β-расщепления и других свободнорадикальных реакций линолевой кислоты, могут образовываться самые разные соединения. Подробнее о продуктах разложения при β-расщеплении см. работу [52]. Подобные цепочки превращений наблюдаются и у других ненасыщенных жирных кислот, что приводит к появлению дополнительных уникальных соединений. Продукты расщепления зачастую содержат двойные связи и (в некоторых случаях) неповрежденные пентадиеновые системы. Эти системы двойных связей могут подвергаться отрыву атома водорода или атаке синглетного кислорода, что приводит в результате к образованию дополнительных продуктов разложения. Хотя выше приведены теоретические продукты разложения линолевой кислоты, в реальности обнаруживаются далеко не все из них, что обусловлено, вероятно, способностью этих соединений к дополнительным реакциям разложения.

4.7.3.2. Дополнительные реакции продуктов разложения жирных кислот

Помимо вышеописанных продуктов реакций гидропероксидов жирных кислот радикалы жирных кислот подвергаются другим реакциям с образованием олефинов, спиртов, карбоновых кислот, кетонов, эпоксидов и циклических соединений (см работу [52]). Алкильные радикалы реагируют с водородом и гидроксильными радикалами, образуя олефины и спирты. Как мы уже отмечали, алкоксильные радикалы являются высокоэнергетическими и могут отрывать водород от других молекул (в частности, жирных кислот или антиоксидантов) с образованием спиртов из жирных кислот. Алкоксильные радикалы могут также терять атом электрона и превращаться в кетоны или соединяться с соседним атомом углерода, образуя эпоксиды. Пероксильные радикалы могут реагировать с двойными связями внутри той же жирной кислоты с образованием циклических соединений типа бициклических эндопероксидов.

Образующиеся при окислительном расщеплении жирных кислот альдегиды влияют на образование побочных вкусов и запахов. В то же время эти альдегиды могут реагировать с нуклеофильными компонентами пищевых продуктов. В частности, они взаимодействуют с сульфгидрильными группами и аминами белков, изменяя функциональные свойства последних. Один из примеров — это способность ненасыщенных альдегидов реагировать с гистидином миоглобина посредством реакции типа присоединения по Михаэлю [60]. Считается, что эта реакция участвует в превращении миоглобина в метмиоглобин, приводя к обесцвечиванию мяса.

4.7.3.3. Окисление холестерина

У холестерина имеется двойная связь между 5- и 6-м атомами углерода. Как и в случае жирных кислот, эта двойная связь чувствительна к атакам свободных радикалов и может разлагаться с образованием спиртов, кетонов и эпоксидов [61]. Наиболее важный путь окисления холестерина начинается с образования гидропероксида при 7-м атоме углерода. Этот гидропероксид может затем разлагаться с образованием алкоксильного радикала, который, в свою очередь, может подвергаться перегруппировке до 5,6-эпоксидов, 7-гидроксихолестерина и 7-кетохолестерина. Эти соединения потенциально цитотоксичны и участвуют в развитии атеросклероза. Продукты окисления холестерина первоначально были выявлены в пищевых продуктах из животного сырья, подвергавшихся тепловой обработке (в вареном мясе, топленом тугоплавком животном жире, лярде и сливочном масле, а также в сухом молоке и яйцепродуктах).

4.7.4. Антиоксиданты

Окислительный стресс испытывают все организмы в кислородсодержащей среде. Соответственно, чтобы противостоять окислению, в биологических системах сформировались защитные антиоксидантные средства. Единого определения антиоксиданта не существует, поскольку имеются самые разные химические механизмы ингибирования окислительных процессов. Биологические ткани, из которых получают пищевые продукты, обычно имеют несколько эндогенных антиоксидантных систем. К сожалению, в процессе приготовления пищи эти антиоксиданты могут быть удалены или эти процессы могут стать причиной окислительного стресса, преодолевающего сопротивление эндогенных для данного продукта антиоксидатных систем. С учетом этого в подвергаемые переработке пищевые продукты обычно вносят дополнительные антиоксиданты. К мерам повышения окислительной стабильности, используемым для увеличения стойкости пищевых продуктов к окислению, относятся контроль образования свободных радикалов, прооксидантов и промежуточных продуктов окисления.

4.7.4.1. Контроль образования свободных радикалов

Многие антиоксиданты замедляют окисление липидов путем захвата свободных радикалов, ингибируя таким образом инициирование и развитие окислительных процессов, а также реакции β-расщепления. Ловушки свободных радикалов (ЛСР, *FRS*) и антиоксиданты, разрывающие цепочку окисления, могут взаимодействовать с пероксильным ($LOO^{\cdot}$) и алкоксильным ($LO^{\cdot}$) радикалами по следующим реакциям:

$$LOO^{\cdot} \text{ или } LO^{\cdot} + \text{ЛСР} \rightarrow LOOH \text{ или } LOH + \text{ЛСР}^{\cdot}. \qquad (4.12)$$

ЛСР ингибируют окисление липидов, поскольку они реагируют со свободными радикалами быстрее, чем ненасыщенные жирные кислоты. Полагают, что ЛСР взаимодействуют главным образом с пероксильными радикалами из-за их более низкого энергетического состояния. Это означает, что они живут дольше (поскольку менее реакционноспособны) и обладают таким образом большей вероятностью вступить в реакцию с низкоэнергетическим атомом водорода ЛСР. Такое состояние прямо противоположно высокоэнергетическим свободным радикалам (например, $^{\cdot}OH$), которые настолько реакционноспособны, что взаимодействуют с молекулами, ближайшими к месту образования ЛСР. Поскольку ЛСР обычно присутствуют в низких концентрациях, они будут реагировать с высокоэнергетическими свободными радикалами с меньшей вероятностью [62].

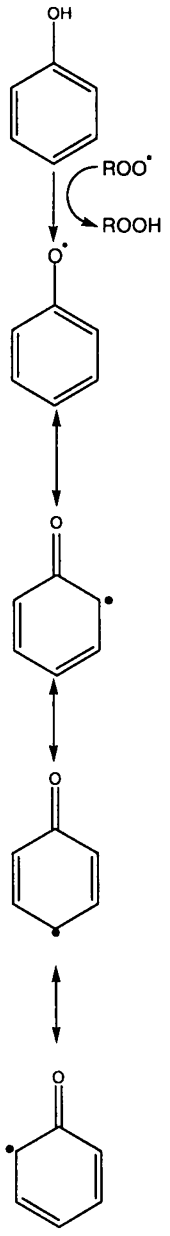


Рис. 4.31. Резонансная делокализация фенольного радикала. По [64]

Эффективность антиоксидантов зависит от способности ЛСР отдавать водород свободному радикалу. Поскольку энергия атома водорода у ЛСР ниже, передача водорода свободному радикалу более энергетически выгодна и протекает быстрее. Способность ЛСР отдавать свой водород свободному радикалу можно спрогнозировать по стандартным одноэлектронным потенциалам восстановления [63]. Любое соединение с восстановительным потенциалом меньшим, чем восстановительный потенциал свободного радикала (или окисленного фрагмента), способно отдавать свой атом водорода этому свободному радикалу, даже если реакция кинетически не осуществима. Например, ЛСР, включающие α-токоферол ($E^{\circ\prime} = 500$ мВ), пирокатехин (катехол) ($E^{\circ\prime} = 530$ мВ) и аскорбат ($E^{\circ\prime} = 282$ мВ), обладают восстановительным потенциалом меньшим, чем у пероксильных радикалов ($E^{\circ\prime} = 1000$ мВ), и поэтому способны отдавать свой водород пероксильному радикалу с образованием гидропероксида.

Эффективность ЛСР зависит также от энергии образующегося в результате радикала (ЛСР$^{\cdot}$). Если ЛСР$^{\cdot}$ является низкоэнергетическим радикалом, то снижается вероятность, что он ускоряет окисление ненасыщенных жирных кислот. Эффективные ЛСР образуют низкоэнергетические радикалы благодаря резонансной делокализации (рис. 4.31) и продуцируют также радикалы, которые не реагируют быстро с кислородом с образованием гидропероксидов. Если ловушки радикалов образуют гипероксид, он может подвергаться реакциям разложения, приводящим к образованию дополнительных радикалов, вызывающих окисление ненасыщенных жирных кислот. ЛСР$^{\cdot}$ могут участвовать в реакциях обрыва с другим ЛСР$^{\cdot}$ или липидным радикалом, образуя нерадикальные частицы, то есть каждая ЛСР способна инактивировать не менее двух свободных радикалов, причем первый инактивируется, когда ЛСР взаимодействует с пероксильным или алкоксильным радикалами, а второй — когда ЛСР$^{\cdot}$ вступает в реакции обрыва с другим ЛСР$^{\cdot}$ или липидным радикалом (рис. 4.32).

Многими свойствами эффективной ЛСР обладают фенольные соединения. Они отдают атом водорода своих гидроксильных групп, а образующийся в результате фенольный радикал может иметь низкую энергию, поскольку он делокализован по структуре фенольного кольца. Эффективность фенольных ЛСР зачастую увеличивают заместители на фенольном кольце, которые повышают способность ЛСР отдавать водород липидным радикалам и/или повышают стабильность ЛСР$^{\cdot}$ [64]. В пищевых продуктах эффективность фенольных ЛСР зависит также от их летучести, стойкости к значениям pH и полярности. Примеры ЛСР, наиболее распространенных в пищевых продуктах, приведены ниже.

Токоферолы. Токоферолы — это группа соединений, имеющих гидроксилированную кольцевую систему (хроманольное кольцо) с фитольной цепью (рис. 4.33). Отличия в гомологах токоферола связаны с метильными группами хроманольного кольца — они бывают α-триметилированными

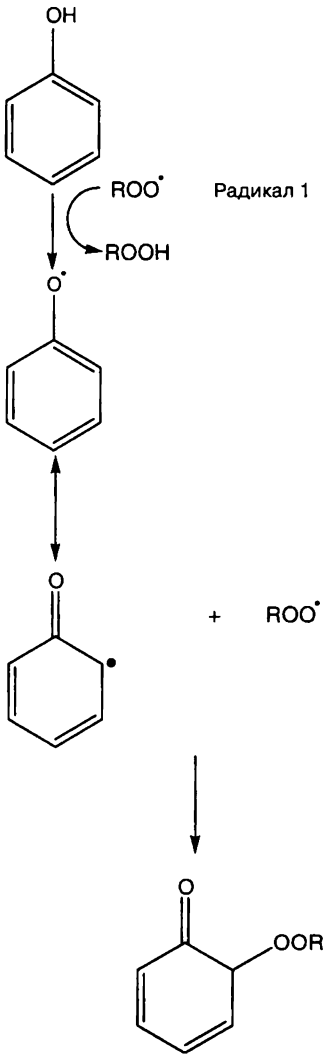


Рис. 4.32. Реакции обрыва между радикалом антиоксиданта и липидным пероксильным радикалом (ЛСР•)

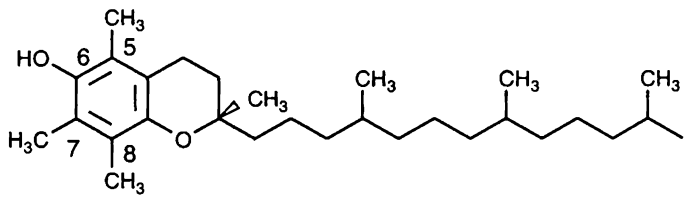


Рис. 4.33. Структурная формула α-токоферола

(в позициях 5, 7 и 8); β-диметилированными (в позициях 5 и 8) и γ-диметилированными (в позициях 7 и 8); а также δ-монометилированными (в позиции 8). Токотриенолы отличаются от токоферолов тем, что в их фитольной цепи в положениях 3', 7' и 11' имеются три двойные связи. У токоферолов три асимметрических атома углерода и, таким образом, у каждого гомолога может быть восемь возможных стереоизомеров. Природные токоферолы обнаружены во всех *rac*- или *RRR* конфигурациях. Синтетические токоферолы имеют стериоизомер с сочетанием *R*- и *S*-конфигураций. Очень важна стереоизомерная конфигурация α-токоферола, поскольку достаточной активностью витамина Е обладают только *RRR*- и 2*R*-стереоизомеры (*RSR, RRS* и *SRR*). Содержание α-токоферола используется в США для обоснования уровня потребления витамина Е (*DRI*) с пищей [65]. В виде биологически активной добавки (БАД) α-токоферол реализуется в твердой товарной форме метилового эфира. В желудочно-кишечном тракте этот метиловый эфир гидролизуется с регенерацией α-токоферола. Токоферолы в форме метилового эфира блокируют гидроксильную группу и повышают стойкость молекул к окислительному разложению до переваривания. Следует отметить, что блокирование гидроксильной группы метиловым эфиром лишает токоферол антиоксидантной активности, то есть метиловые эфиры токоферолов в пищевых продуктах не могут быть эффективными антиоксидантами.

Реакция между токоферолами и липидными пероксидными радикалами приводит к образованию липидного гидропероксида и различных резонансных структур токофероксильных радикалов. Последние могут взаимодействовать с другими липидными радикалами и друг с другом с образованием различных конечных продуктов реакции. Типы и количества этих продуктов зависят от скорости окисления, радикальных частиц, физической локализации (например, внутриклеточные и мембранные липиды), а также от концентрации токоферола (подробнее об этом см. работу [62]). Токоферолы обычно нерастворимы в воде, однако существенно различаются по полярности, причем α-токоферол (триметилированный) является самым неполярным, а δ-токоферол (монометилированный) — самым полярным. Эти различия в полярности меняют поверхностную активность токоферолов, что влияет на их антиоксидантную активность (см. раздел 4.7.4.5).

Синтетические фенольные соединения. Фенол сам по себе не является хорошим антиоксидантом, но путем добавления в фенольное кольцо заместителей его антиоксидантную активность можно увеличить. С учетом этого основную массу синтетических антиоксидантов составляют замещенные монофенольные соединения. Наиболее распространенные синтетические ЛСР, используемые в пищевых продуктах, — это бутилированный гидрокситолуол (*BHT*), бутилированный гидроксианизол (*BHA*), третичный бутилгидрохинон (*TBHQ*) и пропилгаллат (рис. 4.34). Эти синтетические ЛСР располагаются по возрастанию поляр-

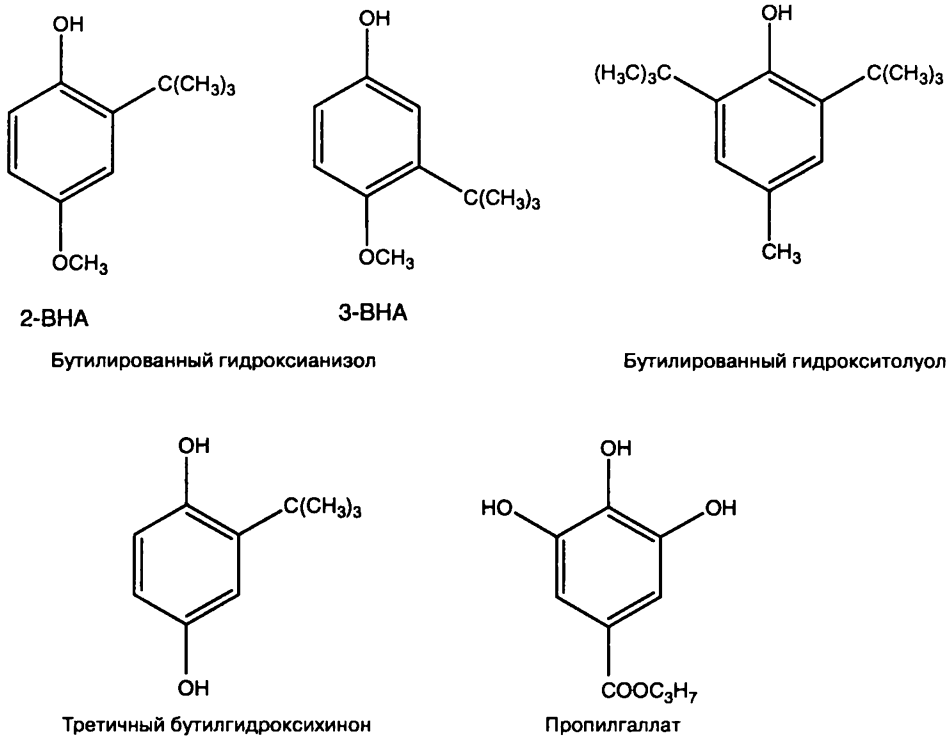


Рис. 4.34. Стуктурные формулы синтетических пищевых антиоксидантов

ности в следующем порядке: *BHT > BHA > TBHQ* > пропилгаллат (о важности полярности антиоксидантов см. раздел 4.7.4.5). Как и в случае других ЛСР, при взаимодействии между синтетическими антиоксидантами и липидными радикалами образуются низкоэнергетические резонансно-стабилизированные фенольные радикалы. Низкая энергия синтетических радикалов антиоксидантов означает, что они катализируют окисление ненасыщенных жирных кислот не слишком быстро. Кроме того, радикалы синтетических антиоксидантов действительно неохотно реагируют с кислородом с образованием нестабильных гидропероксидов антиоксидантов, разлагающихся до высокоэнергетических свободных радикалов, способных активировать окисление. Вместо этого они участвуют в реакциях обрыва «радикал–радикал» (см. рис. 4.32). Синтетические производные фенола весьма эффективны в многочисленных пищевых системах, однако их использование в пищевой промышленности в последнее время снижается вследствие повышения внимания к безопасности продуктов для здоровья и увеличения спроса на натуральные продукты.

Фенольные соединения растительного происхождения. В растениях содержатся самые разные по составу фенольные соединения, в том числе простые фенольные соединения, фенольные кислоты, антоцианины, производные гидроксикоричной кислоты и флавоноиды. Эти фенольные соединения широко распространены во фруктах, пряностях, чае, кофе, семенах и крупах. Все эти классы фенольных соединений имеют структурные особенности ЛСР, хотя их активность существенно различается. К факторам, влияющим на активность растительных фенольных соединений относительно улавливания свободных радикалов, относятся положение гидроксильных групп и степень гидроксилирования, полярность, растворимость, восстановительный потенциал, стабильность соединения при технологической переработке и стабильность конкретного фенольного радикала. Наиболее важным промышленным источником натуральных фенольных соединений, используемых как пищевые добавки для ингибирования окисления липидов с помощью ЛСР, являются экстракты розмарина. Основными соединениями со свойствами ЛСР в экстрактах розмарина являются карнозная кислота, карнозин и розмариновая кислота (рис. 4.35). Экстракты розмарина могут ингибировать окисление липидов в самых разных пищевых продуктах, в том числе в мясе, жирах, маслах и жировых эмульсиях [66–68]. Использование фенольных антиоксидантов из неочищенных рас-

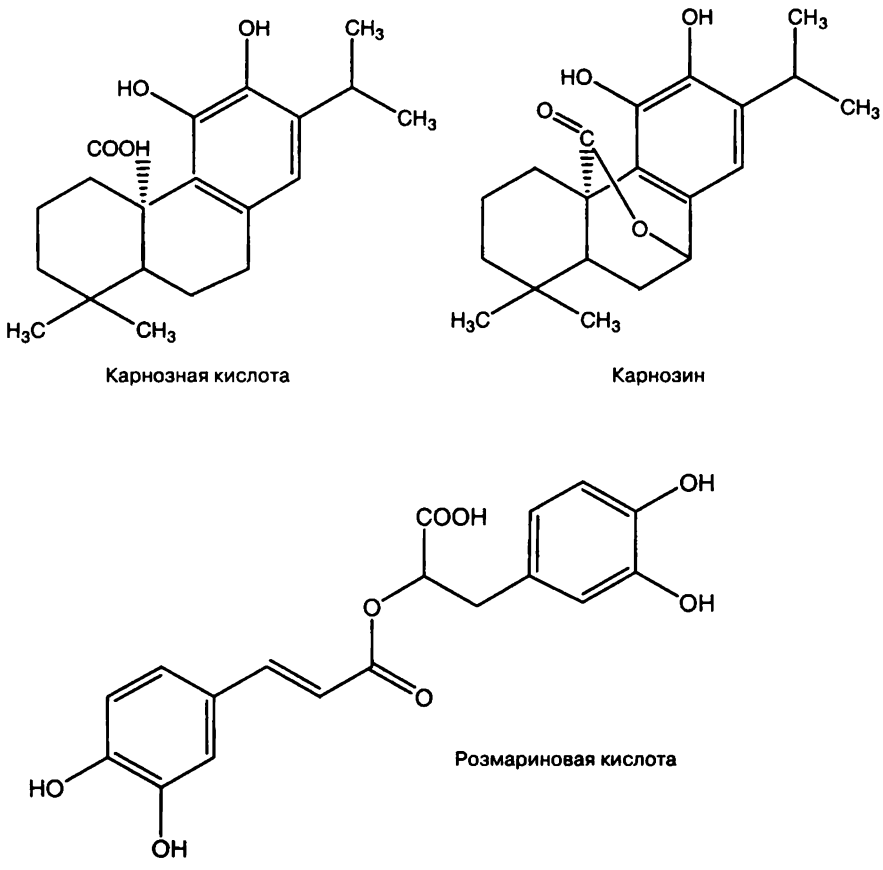


Рис. 4.35. Стуктурные формулы фенольных антиоксидантов из экстрактов розмарина

тительных экстрактов типа розмарина зачастую ограничивается присутствием в них вкусоароматических соединений, в частности монотерпенов. Фенольные соединения в продуктах из растительного сырья и маслах важны для эндогенной стойкости к окислению этих продуктов. Содержание фенольных соединений в растениях существенно варьирует в зависимости от степени спелости, сорта, типа растительной ткани, условий произрастания, времени с момента сбора урожая и от условий хранения [69–71].

Аскорбиновая кислота и тиолы. Свободные радикалы зачастую образуются в водной фазе пищевого продукта в результате ряда процессов типа реакции Фентона, которая приводит к образованию из пероксида водорода гидроксильных радикалов. Свободные радикалы могут быть поверхностно активны, то есть они могут мигрировать и проникать через границу раздела водной и жировой фаз в жировых дисперсиях. Для защиты от свободных радикалов, образовавшихся в водной фазе, в биологических системах имеются водорастворимые соединения, способные улавливать свободные радикалы — так, аскорбиновая кислота и тиолы улавливают свободные радикалы с образованием низкоэнергетических радикалов (см. работу [72]). Такие тиолы, как цистеин и глутатион могут участвовать в повышении стабильности пищевых продуктов к окислению, но их редко вносят в продукты в качестве антиоксидантов (единственным исключением являются тиолы белков, способные ингибировать окисление липидов в пищевых продуктах) [72]. Аскорбат (и его изомер эриторбовая кислота) также способен улавливать свободные радикалы. Они имеют почти одинаковую активность, но эриторбовая кислота более рентабельна. Аскорбиновая кислота поставляется также в виде конъюгата с пальмитиновой кислотой. Этот конъюгат жирорастворим и поверхностно активен, что делает его эффективным антиоксидантом в жидких маслах и эмульсиях. В желудочно-кишечном тракте аскорбилпальмитат гидролизуется до аскорбиновой и пальмитиновой кислот, в связи с чем для него нет ограничений по уровню потребления.

4.7.4.2. Контроль прооксидантов

Скорость окисления липидов в пищевых продуктах существенно зависит от концентрации прооксидантов и их активности (в частности, переходных металлов, синглетного кислорода и ферментов). Контроль прооксидантов является очень эффективной стратегией повышения стойкости пищевых продуктов к окислению. На активность переходных металлов и синглетного кислорода влияют как эндогенные, так и экзогенные антиоксиданты.

Контроль содержания металлов с прооксидантными свойствами. Примером важных переходных металлов с прооксидантными свойствми могут служить железо и медь, которые ускоряют окисление липидов, стимулируя разложение гидропероксидов. Прооксидантная активность металлов изменяется с помощью хелирующих (комплексообразующих) соединений. Хелаты ингибируют активность этих металлов по одному или нескольким перечисленным ниже механизмам:

ингибирование окислительно-восстановительного цикла;

заполнение всех сайтов связывания;

образование нерастворимых комплексов металла и/или затруднение стерических взаимодействий между металлом и липидами (или промежуточными продуктами окисления, например, гидропероксидами) [73].

Некоторые соединения, образующие в пищевых продуктах хелатные комплексы с металлами, могут усиливать окислительные реакции путем повышения растворимости металла и/или изменением окислительно-восстановительного потенциала. Способность такого соединения ускорять или ингибировать прооксидантную активность зависит от доли в нем металла. Например, препарат *EDTA* (этилендиамин тетрауксусная кислота) неэффективен и ускоряет окисление при соотношении *EDTA* железо меньше 1 и, наоборот, является антиоксидантом, если соотношение *EDTA* железо больше 1 [74]. Прооксидантное поведение таких соединений обусловлено их способностью повышать растворимость переходных металлов.

В основных хелирующих металлы соединениях, обнаруженных в пищевых продуктах, содержатся разные карбоновые кислоты (например, *EDTA* и лимонная кислота) или фосфатные группы (например, полифосфаты и фитат). Чтобы быть активными, эти соединения должны быть ионизированы, и их активность снижается при значениях pH ниже значений pK_a ионизующихся групп. К наиболее широко распространенным хелатным соединениям, используемым в качестве пищевых добавок, относятся лимонная кислота, *EDTA* и полифосфаты. Эффективность фосфатов повышается с увеличением числа фосфатных групп — так, триполифосфат и гексаметафосфат более эффективны, чем ортофосфорная кислота [75]. Регулирование содержания металлов-прооксидантов может также осуществляться с помощью связывающих металлы белков, например, трансферрина, фосвитина, лактоферрина, ферритина и казеина (см. работу [73]).

Контроль синглетного кислорода. Как мы уже отмечали, синглетный кислород — это возбужденное состояние кислорода, которое способствует образованию гидропероксидов липидов. Обширной группой (более 600 различных соединений) полиенов с окраской от желтой до красной являются каротиноиды. Активность синглетного кислорода можно контролировать с помощью каротиноидов как химическим, так и физическим способом ее подавления [76, 77]. Каротиноиды химически связывают синглетный кислород, когда он атакует их двойные связи. Эта реакция приводит к образованию оксигенированных продуктов разложения каротиноидов — альдегидов, кетонов и эндопероксидов. При разложении каротиноидов происходит обесцвечивание продуктов. Более эффективным механизмом инактивации синглетного кислорода каротиноидами является физическое связывание. Каротиноиды физически удаляют синглетный кислород за счет перехода энергии от синглетного кислорода к каротиноиду с образованием каротиноида в возбужденном состоянии и триплетного кислорода в основном состоянии. Из возбужденного каротиноида энергия рассеивается при перемешивании с окружающим растворителем, возвращая каротиноид в основное состояние. Для этого процесса необходимо наличие в каротиноиде девяти и более конъюгированных двойных связей. Для физического связывания синглетного кислорода зачастую более эффективны каротиноиды с оксигенированными β-иононовыми оконечными кольцевыми структурами. Каротиноиды также могут физически поглощать энергию фотоактивируемых сенсибилизаторов, например, рибофлавина, не позволяя этому фотосенсибилизатору способствовать образованию синглетного кислорода.

Контроль LOX. Активными катализаторами окисления липидов, присутствующим в растительных и некоторых животных тканях, являются липоксигеназы. Активность *LOX* можно регулировать путем тепловой инактивации и с помощью программы селекции растений, направленной на снижение содержания этих ферментов в съедобных тканях.

4.7.4.3. Контроль промежуточных продуктов окисления

В пищевых продуктах встречаются соединения, которые опосредованно влияют на скорость окисления липидов путем взаимодействия с металлами-прооксидантами или кислородом, в ходе которого образуются реакционноспособные частицы. К таким соединениям относятся супероксид-анион и гидропероксиды.

Супероксид-анион участвует в окислительных реакциях, восстанавливая переходные металлы до более активного состояния или способствуя отщеплению железа от белков. Кроме того, при значениях pH ниже pK_a (то есть 4,8) этот супероксид образует пергидроксильный радикал ($HOO^{\cdot}$), который непосредственно катализирует окисление липидов [78]. Из-за прооксидантной природы анион-супероксида в окислительных реакциях в биологических системах содержится супероксиддисмутаза (*SOD*), *которая* катализирует превращение анион-супероксида в пероксид водорода по следующей реакции:

$$2^{\cdot}O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (4.13)$$

Пероксиды в реакциях окисления являются важными промежуточными продуктами, поскольку они при воздействии переходных металлов, облучения и повышенных температур разлагаются с образованием свободных радикалов. Пероксид водорода присутствует в пищевых продуктах благодаря или непосредственному его внесению (например, при асептических технологических операциях), или его образованию в биологических тканях по механизмам, включающим диспропорционирование супероксида под воздействием *SOD* и активности пероксисом* и лейкоцитов. Инактивация пероксида водорода катализируется каталазой (гем-содержащим ферментом) в соответствии со следующей реакцией [78]:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \qquad (4.14)$$

Глутатионпероксидаза — это селенсодержащий фермент, способный разлагать и липидные гидропероксиды, и пероксид водорода, используя в виде дополнительного субстрата восстановленный глутатион (*GSH*) [78]:

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG \qquad (4.15)$$

или

$$LOOH + 2GSH \rightarrow LOH + H_2O + GSSG \qquad (4.16)$$

где *GSSG* – это окисленный глутатион, а LOH – спирт, полученный из жирной кислоты.

4.7.4.4. Взаимодействия между антиоксидантами

В пищевых системах обычно содержатся эндогенные многокомпонентные антиоксидантные системы, но в перерабатываемые пищевые продукты можно вносить и экзогенные антиоксиданты. Наличие различных антиоксидантов повышает стойкость продукта к окислению во многом благодаря взаимодействиям между ними. Для описания взаимодействия между антиоксидантами зачастую используют понятие синергизма, при котором эффект от сочетанного действия антиоксидантов больше, чем сумма эффектов от отдельных антиоксидантов. Вместе с тем во многих случаях эффективность различных сочетаний антиоксидантов не превышает, а то и меньше их суммарного эффекта. Если для эффективного увеличения срока годности продуктов можно использовать различные сочетания антиоксидантов, то говорить об их синергизме следует очень осторожно.

Повышенная антиоксидантая активность может быть обнаружена в присутствии двух и более различных ЛСР. В присутствии многочисленных ЛСР возможна ситуация, когда одна ЛСР (ведущая или основная) будет реагировать с липидными свободными радикалами быстрее, чем другие, благодаря меньшей

* Пероксисома — обязательная органелла эукариотической клетки, ограниченная мембраной и содержащая большое количество ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. — *Примеч. ред.*

энергии диссоциации связей или благодаря тому, что ее физическая локализация ближе к месту образования свободных радикалов. В присутствии многочисленных ЛСР ведущая ЛСР, окисляющаяся быстрее, может иногда регенерироваться вторичной ЛСР с передачей свободного радикала от первичной ЛСР ко вторичной. Этот процесс характерен для α-токоферола и аскорбиновой кислоты. В этой системе α-токоферол выступает как ведущая ЛСР благодаря его присутствию в жировой фазе. Аскорбиновая кислота затем восстанавливает токофероксильный радикал или токоферилхинон обратно до α-токоферола, что приводит в результате к образованию дегидроаскорбата [63]. Суммарный результат заключается в том, что первичная ЛСР (α-токоферол) возвращается в активное состояние, в котором он может продолжать улавливать свободные радикалы в жировой фазе пищевого продукта.

Сочетание хелирующих соединений и ЛСР может привести к повышенному ингибированию окисления липидов [6]. Такие усиленные взаимодействия возникают благодаря «экономичному» действию хелирующего соединения, то есть оно снижает число образующихся в продукте свободных радикалов путем ингибирования катализируемого металлом окисления, что замедляет инактивирование ЛСР такими реакциями, как обрыв цепи или автоокисление.

Так как мультикомпонентные антиоксидантные системы ингибируют окисление по различным механизмам (например, ЛСР, комплексообразование с металлами, связывание синглетного кислорода), то использование сочетаний антиоксидантов может существенно повысить стойкость пищевого продукта к окислению. При разработке новых антиоксидантных систем учитывают, что используемые антиоксиданты должны иметь различные механизмы действия и/или физические свойства. Решение, какие именно антиоксиданты будут наиболее эффективными, зависит от типа катализатора окисления, физического состояния пищевого продукта, а также факторов, влияющих на активность собственно антиоксидантов (значения pH, температуры, способности к взаимодействию с другими соединениями пищевых продуктов).

4.7.4.5. Локализация антиоксидантов

В зависимости от физической природы конкретного липида эффективность антиоксидантов широко варьирует [52, 79]. Например, гидрофильные антиоксиданты зачастую менее эффективны в эмульсиях типа «масло-в-воде», чем липофильные, тогда как в жидких жирах и маслах последние менее эффективны, чем гидрофильные. Это свойство называют «парадоксом полярности». Отличия в эффективности антиоксидантов в жидких жирах и маслах, а также в эмульсиях типа «вода-в-масле» обусловлены отличиями в их локализации в этих двух системах. Полярные антиоксиданты более эффективны в жидких жирах и маслах, поскольку могут накапливаться на поверхности раздела воздушной и жировой фазы или в обращенных мицеллах внутри жировой фазы, то есть именно там, где реакции окисления липидов происходят интенсивнее из-за повышенного содержания кислорода и прооксидантов. В отличие от этого неполярные антиоксиданты более эффективны в эмульсиях типа «масло-в-воде», поскольку они удерживаются внутри глобул жира и/или накапливаются на поверхности жировой и водной фаз. При такой локализации происходят взаимодействия между гидропероксидами на поверхности жировых глобул и прооксидантами водной фазы. И наоборот, в эмульсиях типа «масло-в-воде» полярные антиоксиданты склонны к распределению внутри непрерывной водной фазы, где они менее способны к защите липидов от окисления.

4.7.5. Прочие факторы, влияющие на скорость окисления липидов

Концентрация кислорода. Чаще всего для ингибирования окисления липидов применяют снижение содержания кислорода, однако добавление кислорода к алкильному радикалу является диффузионно ограниченной (быстрой) реакцией, и поэтому для эффективного ингибирования окисления липидов большая часть кислорода должна быть из системы удалена. Поскольку растворимость кислорода в жирах больше, чем в воде, то удаление кислорода для ингибирования окисления липидов может быть затруднено (за исключением случаев вакуумирования или полной замены кислорода инертным газом, в частности азотом).

Температура. При повышении температуры скорость окисления липидов обычно возрастает, но одновременно снижается растворимость кислорода, так что в ряде случаев высокие температуры могут замедлять процессы окисления, что и происходит в нагретых жидках жирах и маслах. При жарке пищевых продуктов в горячем масле происходит его аэрация с ускорением процессов окисления. Повышение тем-

пературы может также стать причиной расщепления и улетучивания антиоксидантов, а в случае антиоксидантных ферментов приводить к их инактивации из-за денатурации.

Площадь поверхности. Увеличение площади поверхности жировой фазы повышает скорость окисления липидов, так как увеличивается площадь их контакта с кислородом и прооксидантами.

Активность воды. При удалении из пищевой системы воды скорость окисления липидов обычно снижается. Это происходит, скорее всего, из-за снижения мобильности реагентов — переходных металлов и кислорода. В некоторых пищевых продуктах удаление влаги приводит к ускорению окисления липидов, которое при низкой активности воды ($a_w \leq 0{,}3$) обусловлено уменьшением защитного слоя сольватированной воды вокруг гидропероксидов липидов [80].

4.7.6. Способы измерения степени окисления липидов

По описанным выше путям окисления липидов образуются многочисленные продукты окисления отдельных жирных кислот. Эти продукты зачастую содержат двойные связи и (в некоторых случаях) неповрежденные пентадиеновые системы. Такие системы двойных связей могут подвергаться дальнейшим воздействиям с отрывом атомов водорода либо атакам синглетного кислорода. Все это приводит в результате к образованию дополнительных продуктов расщепления. Поскольку в пищевых жирах и маслах содержатся многочисленные ненасыщенные жирные кислоты и они могут подвергаться действию нескольких разных прооксидантов, то возможно образование сотен продуктов расщепления. Из-за сложности этих последовательных химических реакций анализ окисления липидов существенно затрудняется. Далее мы вкратце рассмотрим наиболее распространенные методы анализа продуктов окисления пищевых жиров и масел.

4.7.6.1. Органолептический анализ

Органолептический анализ — это своего рода «золотой стандарт» определения степени окисления липидов, поскольку это единственный способ, который непосредственно отслеживает образование побочных привкусов и запаха в результате реакций окисления. Кроме того, органолептический анализ — это довольно чувствительный метод, поскольку человек способен обнаруживать определенные вкусоароматические соединения при их содержании ниже или близко к порогу обнаружения химическими и инструментальными методами. Органолептический анализ степени окисления липидов должен проводиться специально подготовленными людьми. Такое обучение обычно специфично для каждого пищевого продукта, поскольку продукты окисления различных жирных кислот могут характеризоваться разными органолептическими профилями. Из-за необходимости профессиональной подготовки органолептический анализ зачастую требует длительного времени, обходится очень дорого и обычно не подходит для ускоренного всестороннего анализа при контроле качества. Этим во многом и было обусловлено появление многих химических и инструментальных методов анализа, которые приносят наибольшую пользу, если их результаты коррелируют с данными органолептического анализа. Для выявления окислительной порчи пищевых продуктов существуют многочисленные тесты, наиболее распространенные из которых с их преимуществами и недостатками мы рассмотрим далее.

4.7.6.2. Первичные продукты окисления

Первичные продукты окисления липидов — это соединения, образованные на стадиях начала и развития окисления. Поскольку это первые продукты окисления, то в ходе окислительного разложения липидов они возникают довольно рано, и на более поздних стадиях окисления концентрация этих соединений снижается по мере замедления скорости их образования по сравнению со скоростью расщепления. Недостаток использования первичных продуктов окисления для измерения степени окисления состит в том, что они нелетучи и поэтому не участвуют непосредственно в образовании побочных вкусов и запахов. Кроме того, в определенных условиях (при высоких температурах жарочных жиров или при высоком содержании реакционноспособных переходных металлов) концентрация этих первичных продуктов окисления может слегка увеличиваться и при высоких скоростях их расщепления. Это приводит к ложным результатам, так как даже в очень прогорклом масле содержание первичных продуктов окисления может быть очень невелико.

Конъюгированные двойные связи. На стадии начала окисления в полиненасыщенных жирных кислотах при отрыве атома водорода быстро образуются конъюгированные двойные связи. Конъюгированные диены характеризуется максимальным светопоглощением при длине волны 234 нм с молярным коэффициентом экстинкции 2,5 10^4 $M^{-1} \cdot см^{-1}$ [81]. По сравнению с другими методами дает средний уровень чувствительности. Конъюгированные диены полезны в случае простых жировых систем, но зачастую неэффективны в сложных пищевых системах с многочисленными соединениями, которые также поглощают свет при близких длинах волн и тем самым являются причиной помех. Иногда содержание конъюгированных диенов и гидропероксидов липидов используют взаимозаменяемо, поскольку многие гидропероксиды липидов содержат конъюгированные диеновые системы. Вместе с тем следует воздерживаться от использования этой эквивалентности, если продукты разложения жирных кислот могут содержать конъюгированные двойные связи и если мононенасыщенные жирные кислоты (например, олеиновая) образует гидропероксиды без конъюгированной диеновой системы. Содержание в пищевых продуктах конъюгированных триенов можно измерить при длине волны 270 нм. Этот метод пригоден только для липидов с более чем тремя двойными связями и поэтому ограничен высоконенасыщенными жирами и маслами, например, льняным маслом и рыбьим жиром.

Гидропероксиды липидов. Очень распространенным способом определения степени окисления липидов является измерение содержания гидропероксидов жирных кислот. Большинство используемых методов основаны на способности гидропероксидов окислять некое соединение-индикатор. Содержание пероксида выражают в миллиэквивалентах (мэкв) кислорода на 1 кг жира (масла), причем 1 мэкв соответствует 2 ммоль гидропероксида. В наиболее распространенном методе титрования используется инициированное гидропероксидом превращение йодида в йод. Йод затем титруют тиосульфатом натрия с образованием йодида, количество которого измеряют с использованием в качестве индикатора крахмала [82]. Этот метод относительно нечувствителен с пределом обнаружения 0,5 мэкв/кг жира и может требовать до 5 г липида. На практике его используют только для отделенных или жидких жиров и масел. Кроме того, можно использовать активированное гидропероксидом липида окисление иона двухвалентного железа до трехвалентного, причем ионы трехвалентого железа обнаруживают с помощью ион-специфических хромофоров типа тиоцианата или диметилфенола оранжевого [83]. Эти методы намного более чувствительны, чем метод титрования йода тиосульфитом натрия. Хромофор, образующийся из комплекса «тиоцианат-железо III» имеет коэффициент экстинкции 4,0 10^4 $M^{-1} \cdot см^{-1}$, позволяющий проводить анализ с миллиграммовыми количествами жиров [83].

4.7.6.3. Вторичные продукты окисления

Вторичные продукты окисления липидов — это соединения, образующиеся при разложении гидропероксидов жирных кислот посредством реакций типа β-расщепления. Как мы уже отмечали, в процессе окисления пищевых жиров могут образовываться сотни различных летучих и нелетучих соединений. Поскольку теоретически невозможно определить все эти соединения одновременно, используемые методы определения обычно направлены на анализ одного соединения или некоторого класса соединений. Недостаток таких методов состоит в том, что в результате разложения гидропероксидов липидов происходит образование вторичных продуктов, и в некоторых случаях (например, в присутствии антиоксидантов) концентрации вторичных продуктов могут быть малыми, а первичных продуктов окисления — высокими. Кроме того, соединения, содержащие амино- и сульфгидрильные группы (например, белки), могут взаимодействовать со вторичными продуктами реакции, содержащими такие функциональные группы, как альдегиды, что затрудняет их определение. Преимуществом этих методов является то, что с их помощью можно определить содержание многих продуктов разложения жирных кислот, которые непосредственно ответственны за побочные привкусы и запахи прогорклых жиров, и поэтому их результаты лучше коррелируют с данными органолептического анализа.

Анализ летучих вторичных продуктов окисления. Летучие продукты окисления липидов обычно определяют методом газовой хроматографии с использованием прямого инжектирования, статического или динамического анализа паровой фазы над жидкостью или твердофазной микроэкстракции (*SPME*) [84]. При использовании этих систем степень окисления липидов можно определить по содержанию специфических продуктов окисления, например, гексаналя (для липидов с высоким содержанием ω-6 жирных кис-

лот) и пропаналя (для липидов, богатых ω-3 жирными кислотами), по содержанию определенных классов продуктов окисления (например, углеводородов или альдегидов), а также по общему содержанию летучих соединений, используемых в качестве индикаторов. Каждый из этих методов может давать для одного и того же продукта разные профили летучих соединений, что определяется различиями в способности каждого метода выделять и собирать летучие вещества из исследуемого образца. Преимуществом определения летучих продуктов окисления липидов является хорошая корреляция с данными органолептического анализа, а недостатком — высокая стоимость оборудования и сложности с анализом большого количества образцов (особенно для быстроокисляющихся липидов), поскольку для анализа требуется много времени. Кроме того, в этих методах зачастую необходима стадия нагревания для повышения концентрации летучих соединений в воздушном пространстве над образцом. Для некоторых пищевых продуктов, в частности мяса, эти стадии нагревания могут увеличить скорость окисления липидов из-за тепловой обработки продукта. В общем случае образцы липидов следует отбирать при наименьшей возможной температуре. Еще одна проблема — это потеря летучих соединений в жарочных жирах в ходе перегонки с водяным паром.

Карбонильные соединения. Карбонилы, образующиеся в результате окисления липидов, можно определить путем реакции липидов с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием соответствующих гидразонов, поглощающих свет в диапазоне длин волн 430–460 нм. Этот метод имеет определенные ограничения из-за присутствия в пищевых продуктах других карбонильных соединений, создающих помехи [82]. Для отделения карбонилов, образующихся при окислении липидов, от соединений-«помех» разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), но он довольно сложен и требует много времени, в связи с чем при рутинных анализах пищевых липидов его не применяют.

Содержание карбонильных соединений можно определить также путем их соединения с анизидином (метоксианилином) с образованием продуктов, которые поглощают свет с длиной волны 350 нм [52]. Этот метод весьма полезен, поскольку позволяет определять содержание нелетучих высокомолекулярных карбонильных соединений, что делает его пригодным для анализа жарочных жиров, в которых летучие продукты окисления теряются в результате перегонки с водяным паром. Кроме того, анизидин применяют также для определения степени окисления липидов в рыбьем жире, поскольку в ходе очистки его обычно подвергают активной перегонке с водяным паром. Еще одно преимущество анизидинового теста при анализе рыбьего жира — это возможность определить качество жира до перегонки с водяным паром, поскольку в нем остаются нелетучие высокомолекулярные соединения.

ТБК-тест (тиобарбитуровой кислоты). ТБК-тест основан на реакции между тиобарбитуровой кислотой и карбонилами с образованием в кислой среде красных флуоресцирующих аддуктов [85]. Анализировать можно исходные образцы, их экстракты или дистилляты. Дополнительная информация может быть получена посредством варьирования контрольных температур (25–100 °С) и времени (от 15 мин до 20 ч). К первичным продуктам окисления липидов зачастую относят другие соединения, выявляемые ТБК-тестом, которые на самом деле являются малоновыми диальдегидами (МДА), чьи аддукты сильно поглощают при длине волны 532 нм. МДА — это диальдегид, получаемый в результате двухступенчатого окислительного разложения жирных кислот с тремя и более двойными связями. Это означает, что выход МДА в ходе окисления липидов зависит от жирнокислотного состава, причем более ненасыщенные жирные кислоты дают больше МДА. ТБК может реагировать и с другими альдегидными продуктами окисления липидов, особенно с ненасыщенными альдегидами.

Недостатком ТБК-теста является его неспецифичность, поскольку ТБК способна реагировать с нелипидными карбонильными соединениями — аскорбиновой кислотой, сахарами и продуктами реакций неферментативного потемнения. Эти соединения могут образовывать с ТБК аддукты, поглощающие в диапазоне длин волн 450–540 нм. Зачастую определяют все способные к реакции с ТБК вещества (*TBARS*, соединения, химически активные в реакции с 2-ТБК), которые, как и МДА, могут образовывать розовые хромофоры. Чтобы уменьшить проблемы с соединениями-«помехами», комплексы ТБК-МДА следует определять непосредственно по флуоресценции или ВЭЖХ-методами.

ТБК-тест полезен для определения степени окисления липидов, поскольку он прост и недорог, однако его неспецифичность требует понимания ограничений, чтобы не получить ошибочных выводов. Для минимизации потенциальных ошибок в интерпретации результатов ТБК-теста следует проводить кон-

трольный анализ свежих, неокисленных образцов. Это позволит количественно определить способные к реакции с ТБК соединения, содержание которых в процессе окисления липидов не увеличивается. Тем не менее, ТБК-тест необходимо исключить для пищевых продуктов с высоким содержанием соединений-«помех». Кроме того, не следует пытаться использовать ТБК-тест для сравнения окислительных изменений в пищевых продуктах с различным жирнокислотным составом, поскольку содержание МДА в зависимости от состава жирных кислот меняется.

4.8. Пищевые жиры и их влияние на здоровье человека

4.8.1. Биологическая активность жирных кислот

Если речь заходит о здоровье, то жиры в пищевых продуктах зачастую пользуются плохой репутацией. Поскольку тучность (избыточная масса тела) связана с различными заболеваниями, в том числе сердечно-сосудистыми и диабетом, негативное влияние жиров на здоровье зачастую увязывается с их высокой калорийностью, составляющей 9 ккал/г. Отдельные жиры также ассоциируются с увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний из-за их способности изменять уровень ЛПНП-холестерина (холестерин липопротеинов низкой плотности) в крови. К этой группе липидов относятся насыщенные жирные кислоты, которые повышают содержание ЛПНП-холестерина, и ненасыщенные жирные кислоты, снижающие его. Поскольку содержание ЛПНП-холестерина зачастую соотносят с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, некоторые диеты, направленные на снижение уровня ЛПНП-холестерина, подразумевают снижение содержания насыщенных жирных кислот в рационе до уровня менее 7% калорий, снижение потребления холестерина с пищей до менее 200 мг/сут и потребление растворимых пищевых волокон в количестве 10–25 г/сут [86].

4.8.1.1. *Транс*-изомеры жирных кислот

Транс-изомеры жирных кислот привлекли к себе внимание относительно недавно из-за своей уникальной роли в возникновении сердечно-сосудистых заболеваний благодаря способности повышать уровень ЛПНП-холестерина и снижать уровень ЛПВП-холестерина [87]. Такое поведение частично обусловлено геометрической конфигурацией *транс*-изомеров жирных кислот, которые больше похожи на насыщенные жирные кислоты, чем на ненасыщенные. Изначально согласно правилам этикетирования пищевых продуктов в США *транс*-изомеры жирных кислот включались в группу насыщенных жирных кислот, даже несмотря на то что их биологическая активность была разной. С 1 января 2006 г. содержание *транс*-изомеров жирных кислот было рекомендовано указывать на этикетках всех пищевых продуктов, за исключением тех, в которых содержание жира на порцию составляет менее 0,5 г. К таким продуктам также не предъявляется никаких требований относительно содержания жиров, жирных кислот или холестерина. Несмотря на то что негативным аспектам влияния пищевых жиров на здоровье было посвящено много исследований, тем не менее растет и количество доказательств того, что некоторые пищевые жиры могут уменьшать риск возникновения определенных заболеваний. К таким биоактивным липидам относятся омега-3 жирные кислоты, фитостерины, каротиноиды и КЛК (конъюгированная линолевая кислота).

4.8.1.2. Омега-3 жирные кислоты

По мере совершенствования агротехнических приемов профиль пищевых липидов в промышленно-развитых странах Запада кардинальным образом изменился. Наши предки потребляли примерно одинаковые количества ω-6 и ω-3 жирных кислот. С развитием сельского хозяйства доступность рафинированных жиров, особенно растительных масел, увеличилась, и потребление нами ω-6 и ω-3 жирных кислот стало ближе к соотношению 7 1. Такое очень быстрое изменение потребления с точки зрения эволюции связано с определенными проблемами, поскольку взаимопревращение ω-6 и ω-3 жирных кислот в организме человека происходит очень медленно. Поскольку эти биоактивные липиды играют существенную роль в проницаемости мембран, передаче сигналов на клеточном уровне, экспрессии генов и метаболизме эйкозаноидов, содержание ω-3 жирных кислот в пище имеет большое значение. Потребление ω-3 жирных

кислот с пищей — основа поддержания хорошего здоровья, особенно у беременных и кормящих женщин, людей, страдающих ишемической болезнью сердца, диабетом, нарушениями имуннитета и психики. Существуют убедительные свидетельства того, что потребление ω-3 жирных кислот с пищей основной массой населения в настоящее время недостаточно [9]. Пищевые предприятия пытаются повысить содержание этих биоактивных липидов в выпускаемых продуктах путем прямого их обогащения ω-3 жирными кислотами или использования ω-3 жирных кислот в кормах для скота. Реализации этих подходов препятствует быстрое окисление ω-3 жирных кислот в ходе переработки и хранения обогащенных ими пищевых продуктов. Перечень рыбных продуктов, богатых ω-3 жирными кислотами, приведен в табл. 4.5. Богаты ω-3 жирными кислотами также растительные масла — особенно соевое, масло канолы (разновидность рапсового) и льняное (см. табл. 4.2).

Таблица 4.5
Содержание омега-3 жирных кислот в отдельных рыбопродуктах из разных видов рыб . По [88]

Вид рыбы	Содержание ω-3 жирных кислот, г/100 г
Тунец (белый альбакор)	0,9
Тунец (светлый)	0,2
Атлантический лосось (искусственного разведения)	1,3–2,1
Чавыча (дикая)	1,4
Сельдь	2,0
Скумбрия	0,4–1,8
Треска	0,2
Камбала	0,5

4.8.1.3. Конъюгированная линолевая кислота

Две двойные связи линолевой кислоты обычно разъединены метиленовыми группами, то есть двойные связи разделены одинарными. Эта система двойных связей иногда изменяется при изомеризации в конъюгированную конфигурацию. Изомеризация может протекать при гидрогенизации и обычно происходит при биогидрогенизации, активируемой бактериями в пищеварительном тракте жвачных животных. Эти изомеры, известные как КЛК, привлекли к себе интерес из-за своей способности подавлять онкологические заболевания [89], снижать уровень холестерина в крови [90], ингибировать возникновение диабета и влиять на увеличение массы тела [91]. Разные изомеры характеризуются разными биологическими эффектами, причем 9-*цис*, 11-*транс* линолевая кислота обладает антиканцерогенной активностью, а 10-*транс*, 12-*цис* линолевая кислота влияет на накопление жира в организме. Преобладающим изомером в молочных и мясных продуктах является 9-*цис*, 11-*транс* изомер КЛК. Молекулярные механизмы биологической активности КЛК обусловлены ее способностью регулировать образование эйкозаноидов и экспрессию генов. Следует отметить, что в подтверждение подразумеваемых положительных эффектов КЛК на здоровье человека было проведено довольно мало клинических исследований.

4.8.1.4. Фитостерины

К основным фитостеринам пищевых продуктов относятся ситостерин, кампестерин и стигмастерин. Пищевые фитостерины практически не всасываются в желудочно-кишечном тракте человека. Их биологическая активность основана на том, что они могут ингибировать всасывание и пищевого, и желчного (продуцируемого клетками тонкого кишечника) холестерина [92]. Потребление 1,5–2 г фитостеринов в день может снизить содержание ЛПНП-холестерина на 8–15%. Поскольку фитостерины ингибируют преимущественно всасывание холестерина, они наиболее эффективны при потреблении с пищей, содержащей холестерин. Фитостерины имеют очень высокую температуру плавления и поэтому при температурах, типичных для многих пищевых продуктов, существуют в виде кристаллов жира. Для минимизации кристаллизации фитостерины, как правило, этерифицируют с ненасыщенными жирными кислотами, повышая тем самым их жирорастворимость.

4.8.1.5. Каротиноиды

Каротиноиды — это обширная группа (более 600 различных соединений) жирорастворимых полиенов с окраской от желтой до красной. Основной нутриент, образующийся из каротиноидов, в частности из β-каротина, — это витамин А. Биологическая активность других каротиноидов широко исследовалась, причем изначально интерес был сосредоточен на их антиоксидантой активности. Тем не менее, в ходе клинических испытаний было показано, что β-каротин увеличивает скорость развития рака легких (в испытаниях на курильщиках) [93], но наблюдается ли это действие у некурящих, до сих пор неизвестно. Другие же каротиноиды положительно влияют на здоровье человека, в частности лютеин и зеаксантин повышают остроту зрения и общее состояние здоровья [94]. Эпидемиологические исследования свидетельствуют, что потребление томатов коррелирует уменьшение риска рака простаты [95] и связано с каротиноидом ликопином. Интересно, что томаты после тепловой обработки обладают более выраженным положительным воздействием на здоровье (считается, что благодаря термически индуцированному переходу *транс*-изомеров ликопина в *цис*-ликопин). Повышенная биологическая активность *цис*-ликопена обусловлена его бóльшей биодоступностью.

4.8.2. Низкокалорийные жиры

Одним из дополнительных оздоровительных аспектов пищевых триацилглицеринов является их высокая калорийность. Было сделано много попыток получить с помощью заменителей жира маложирные пищевые продукты с теми же свойствами. Заменители жира (так называемые имитаторы жира) представляют собой нелипидные соединения (белковые или углеводородные), которые могут обеспечивать жироподобные свойства при более низкой калорийности (например, 4 ккал/г у белков против 9 ккал/г у жира). На основе подобного подхода предпринимались попытки получения жировых компонентов без калорий или с более низкой калорийностью. Первыми промышленно полученными некалорийными жирами стали жирнокислотные сложные эфиры сахарозы *Olestra* фирмы *Proctor and Gamble's*. Это соединение некалорийно, поскольку присутствие более 6 фрагментов жирных кислот, присоединенных сложноэфирными связями к сахарозе, стерически мешают липазам осуществлять гидролиз сложноэфирных связей с выделением свободных жирных кислот, которые могут всасываться в кровоток. Неусвояемость этих жирнокислотных сложных эфиров сахарозы означает, что они проходят через ЖКТ и выделяются с фекалиями, что иногда может вызывать диарею. В пищевой промышленности (например, фирмой *Nabisco*) также использовались структурированные липиды с пониженной калорийностью (*Salatrim*). Эти продукты основаны на том принципе, что при гидролизе, осуществляемом панкреатическими липазами, выделяются в виде свободных жирных кислот только те жирные кислоты, которые находятся в *sn*-1 и *sn*-3 позициях триацилглицерина. Если в *sn*-1 и *sn*-3 позициях присоединены высокомолекулярные насыщенные жирные кислоты (с более чем 16 атомами углерода), их выделение может привести ко взаимодействию с двухвалентными катионами и образованию нерастворимых солей с пониженной биодоступностью. В специально разработанных низкокалорийных жирах также используются низкомолекулярные жирные кислоты (с менее чем 6-ю атомами углерода) в *sn*-2 позиции. После гидролиза панкреатическими липазами *sn*-2-моноацилглицерин поглощается клетками эндотелия тонкой кишки. Низкомолекулярные жирные кислоты в *sn*-2 позиции в конечном счете метаболизируются в печени, где при этом высвобождается меньше калорий, чем у высокомолекулярных жирных кислот. Комбинация высокомолекулярных жирных кислот в положениях *sn*-1 и *sn*-3 и низкомолекулярных жирных кислот в положении *sn*-2 дают триацилглицерин, обладающий энергетической ценностью 5–7 кал/г.

4.9. Краткое резюме

Пищевые жиры играют важную роль в пищевых продуктах, оказывая влияние на текстуру, вкус и аромат, нутритивные свойства и энергетическую ценость. По мере накопления знаний о нутритивных свойствах жиров пищевые предприятия смогут модифицировать их физические и химические свойства в целях выпуска полезных для здоровья пищевых продуктов с высокой степенью соответствия запросам потребителей. Это означает, что пищевые продукты будут выпускаться с меньшим содержанием вредных в нутри-

тивном отношении жиров (с пониженным содержанием жира и входящих в него насыщенных жирных кислот и их *транс*-изомеров). Для этого химики, работающие в области науки о питании, должны иметь четкое представление о том, каким образом жиры влияют на текстуру, вкус и аромат пищевых продуктов. Все более широкое применение находят полезные для здоровья пищевые жиры, в частности, включающие омега-3 жирные кислоты и фитостерины. Для производства функциональных пищевых продуктов, содержащих биологически активные липиды, потребуются всесторонние знания физических свойств и химической стабильности жиров, поскольку созданные на их основе продукты могут оказаться химически нестабильными (омега-3 жирные кислоты) или сложными с точки зрения их физической совместимости в пищевом продукте.

Литература

1. Faergemand M., Krog N. Using emulsifiers to improve food texture // *Texture in Foods. — Vol. 1: Semi-Solid Foods* / McKenna B. M., ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. — Ch. 10. [Имеется русский перевод. См. Применение эмульгаторов для улучшения текстуры пищевых продуктов / М. Фергеманд, Н. Крог // Структура и текстура пищевых продуктов. Продукты эмульсионной природы / под ред. Б. М. Мак Кенна. — Гл. 10. — СПб.: Профессия. 2008. — С. 239–277.]
2. Bergenstahl G. Physiochemical aspects of an emulsifier functionality // *Food Emulsifiers and Their Applications* / Hasenhuettl G. L., Hartel R. W., eds. — New York, NY: Chapman & Hall, 1997. — Ch. 6. [Имеется русский перевод. См. Физико-химические аспекты функциональности эмульгаторов / Б. Бергеншталь // Пищевые эмульгаторы и их применение / под. ред. Дж. Хазенхюттля, Р. Гартела. — Гл. 6. — СПб.: Профессия, 2008. — С. 153–176.]
3. Bos M., Nylander T., Arnebrant T., Clark D. C. Protein/emulsifier interactions // *Food Emulsifiers and Their Applications* / Hasenhuettl G. L., Hartel R. W., eds. — New York, NY: Chapman & Hall, 1997. — Ch. 5. [Имеется русский перевод. См. Взаимодействия «белок–эмульгатор» / М. Бос, Т. Ниландер, Т. Арнебрант, Д. Кларк // Пищевые эмульгаторы и их применение / под. ред. Дж. Хазенхюттля, Р. Гартела. — Гл. 5. — СПб.: Профессия, 2008. — С. 107–152.]
4. Deffenbaugh L. B. Carbohydrate/emulsifier interactions // *Food Emulsifiers and Their Applications* / Hasenhuettl G. L. Hartel R. W., eds. — New York, NY: Chapman & Hall, 1997. — Ch. 4. [Имеется русский перевод. См. Взаимодействие между эмульгаторами и углеводами / Л. Б. Деффенбау // Пищевые эмульгаторы и их применение / под. ред. Дж. Хазенхюттля, Р. Гартела. — Гл. 4. — СПб.: Профессия, 2008. — С. 81–106.]
5. Krog N. J., Sparso F. V. Food emulsifiers: their chemical and physical properties // *Food Emulsions* / Friberg S., Larsson K., Sjoblom J. (eds). — 4th ed. — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2004. — Ch. 2.
6. Nielsen S. S. *Food Analysis.* — 3rd ed. — NY: Kluwer Academic, 2003.
7. Wroltsad R. E. (sen. ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* — New York, NY: John Wiley & Sons, 2005.
8. O'Keefe S. F. Nomenclature and classification of lipids // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C. Min D. B. (eds.). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 1–40.
9. Simopoulos A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease // *Am. J. Clin. Nutr.,* 1999, 70, p. 560S–569S.
10. O'Neil M.J. (sen. ed.) *Merck Index.* — 13th ed. — Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., 2001.
11. White P. J. Fatty acids in oilseeds // *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications* / Chow C. K., ed. — 2nd ed. — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2000. — P. 209–238.
12. Ackman R. G. Fatty acids in fish and shellfish // *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*/ Chow C. K., ed. — 2nd ed. — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2000. — P. 153–174.
13. Decker, E. A. The role of stereospecific saturated fatty acid position on lipid nutrition // *Nutr. Rev.,* 1996, 54, p. 108–110.
14. Parish E. J., Boos T. L., Li S. The chemistry of waxes and sterols // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002/ — P. 103–132.
15. Weiss T. J. *Food Oils and Their Uses/* — 2nd ed. — Westport: AVI Publishing, 1983.
16. Gunstone F. D., Padley F. B. *Lipid Technologies and Applications.* — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 1997.
17. Akoh C. C., Min D. B. *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology.* — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002.
18. Israelachvili J. N. *Intermolecular and Surface Forces.* — London: Academic Press, 1992.
19. Hartel R. W. *Crystallization in Foods.* — Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc., 2001.
20. Marangoni A., Narine S. *Physical Properties of Lipids.* — New York, NY:Marcel Dekker, Inc., 2002.
21. Larsson K. Molecular organization in lipids and emulsions // *Food Emulsions* / Friberg S., Larsson K., Sjoblom J. (eds). —4 th ed. — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2004. — Ch. 3.
22. Walstra P. Fat crystallization // *Food Structure and Behaviour* / Blanshard J. M. V., Lillford, P. (eds.). — London: Academic Press, 1987. — Ch. 5.

23. Walstra P. *Physical Chemistry of Foods.* — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2003.
24. Formo M. W. Physical properties of fats and fatty acids // *Bailey's Industrial Oil and Fat Products.* — 5th ed. — Vol. 1 / Swern D. (ed.). — New York, NY: John Wiley & Sons, 1979. — Ch. 3.
25. Gunstone F. D., Norris F. A. Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology. — Oxford: Pergamon Press, 1983.
26. Birker P. J. M. W. L., Padley F. B. Physical properties of fats and oils // *Recent Advances in Chemistry and Technology of Fats and Oils* / Hamilton R. J., Bhati A. (eds.). — London: Elsevier Applied Science, 1987. — Ch. 1.
27. Timms R. E. Crystallization of fats // *Chem. Ind.,* 1991, May, p. 342–349.
28. Timms R. E. Crystallization of fats // *Developments in Oils and Fats* / Hamilton R. J. (ed.). — London: Blackie Academic and Professional, 1995. — Ch. 8.
29. Coupland J. N., McClements D. J. Physical properties of liquid edible oils // *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 1997, 14, p. 1559–1564.
30. Sherman P. *Emulsion Science.* — London: Academic Press, 1968.
31. Moran D. P. J. Fats in spreadable products // *Fats in Food Products.* — London: Blackie Academic and Professional, 1994.
32. Pike O. A. Fat characterization // *Food Analysis* / Nielsen S. S. (ed.). — 3rd ed. — New York, NY: Kluwer Academic, 2003. — P. 227–246.
33. McClements D. J. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques.* — 2nd ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
34. Hernqvist L. On the structure of triglycerides in the liquid state and fat crystallinzation // *Fette Seifen Anstrichmittel,* 1984, 86, S. 297.
35. Hutchings J. B. *Food Color and Appearance.* — 2nd ed. — Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc., 1999.
36. Coupland J. Determination of solid fat content by nuclear magnetic resonance // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* / Wrolstad R. (ed.). — NY: John Wiley & Sons, 2002. — P. D2.4.1–D2.4.18.
37. Lawler P. J., Dimick P. S. Crystallization and polymorphism of fats // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — Ch. 9.
38. Bot A., Floter E., Lammers J. G, Pelan E. Controlling the texture of spreads // *Texture in Foods. — Vol. 1: Semi-Solid Foods* / McKenna B. M. (ed.). — Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. — Ch. 14. [Имеется русский перевод. См. Структурные свойства спредов / А. Бот, Э. Флоттер, Дж. Ламмерс, Э. Пелан // Структура и текстура пищевых продуктов. Продукты эмульсионной природы / под ред. Б. М. Мак Кенна. — Гл. 14. — СПб.: Профессия. 2008. — С. 377–399.]
39. Atkins P. W. *Physical Chemistry.* 5th ed. — Oxford: Oxford University Press, 1994.
40. Mullin J. W. *Crystallization.* — 4th ed. — Oxford: Butterworth-Heinmann, 2001.
41. Dickinson E., McClements D. J., Povey M. J. W. Ultrasonic investigation of the particle size dependence of crystallization in n-hexadecane-in-water emulsions // *J. Coll. Interf. Sci.* 1991, 142, p. 103–110.
42. Boistelle R. Fundamentals of nucleation and crystal growth // *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids* / Garti N., Sato K. (eds.). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 1988. — Ch. 5.
43. Ghotra B. S., Dyal S. D., Narine S. S. Lipid shortenings: a review // *Food Res. Int.,* 2002, 35, p. 1015–1048.
44. Garti N. Yano J. The roles of emulsifiers in fat crystallization // *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems* / Garti N., Sato K. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2001. — P. 211.
45. Johnson L. A. Recovery, refining, converting and stabilizing edible oils // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 223–274.
46. Rousseau D., Marangoni A. G. Chemical interesterification of food lipids: theory and practice // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 301–334.
47. Willis W. M., Marangoni A. G. Enzymatic interesterification // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 1–40.
48. Flack E. Butter, margarine, spreads and baking fats // *Lipid Technologies and Applications* / Gunstone F. D.,Padley F. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 1997. — P. 265–304.
49. McClements D. J. Theoretical prediction of emulsion color // *Adv. Coll. Interf. Sci.,* 2002, 97. p. 63–89.
50. Lonchampt P., Hartel R. W. Fat bloom in chocolate and compound coatings // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.,* 2004, 106, p. 241–274.
51. Min D. B., Boff J. M. Lipid oxidation in edible oil // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C. Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 335–364.
52. Frankel E. N. *Lipid Oxidation.* — Scotland: Oily Press, 1998.
53. Huang S. W., Frankel E. N., German J. B. Antioxidant activity of alpha-tocopherols and gamma-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions // *J. Agric. Food Chem.,* 1994, 42, p. 2108–2114.
54. Abidi S. L., Rennick K. A. Determination of nonvolatile components in polar fractions of rice bran oils // *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 2003, 80, p. 1057–1062.

55. Zhuang H., Barth M. M., Hildebrand D. Fatty acid oxidation in plant lipids // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 413–464.
56. German J. B., Creveling R. K. Identification and characterization of a 15-lipoxygenase from fish gills // *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, p. 2144–2147.
57. Decker E. A., McClements D. J. Transition metal and hydroperoxide interactions: an important determinant in the oxidative stability of lipid dispersions // *Inform*, 2001, 12, p. 251–255.
58. Girotti A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems // *J. Lipid Res.*, 1998, 39, p. 1529–1542.
59. Halliwell B., Gutteridge J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // *Meth. Enzymol.*, 1990, 186, p. 1–88.
60. Faustman C., Liebler D. C., McClure T. D., Sun Q. Alpha, beta-unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation // *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p. 3140–3144.
61. Smith L. L., Johnson B. H. Biological activities of oxysterols // *Free Rad. Biol. Med.*, 1989, 7, p. 285–332.
62. Liebler D. C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E // *Crit. Rev. Toxicol.*, 1993, 23, p. 147–169.
63. Buettner G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α-tocopherol, and ascorbate // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 300, p. 535–543.
64. Shahidi F., Wanasundara J. P. K. Phenolic antioxidants // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1992, 32, p. 67–103.
65. Vitamin E / Food and Nutrition Board, Institute of Medicine // *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids.* — Washington, DC: National Academy Press, 2001. — P. 186–283.
66. Frankel E. N., Huang S.-W., Aeschbach R., Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion // *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, p. 131–135.
67. Aruoma O. I., Halliwell B., Aeschbach R., Loligers J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosol and carnosic acid // *Xenobiotica*, 1992, 22, p. 257–268.
68. Mielche M. M., Bertelsen G. Approaches to the prevention of warmedoven flavour // *Trend. Food Sci. Technol.*, 1994, 5, p. 322–327.
69. Howard L. R., Pandjaitan N., Morelock T., Gil M. I. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season // *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 5891–5896.
70. Britz S. J., Kremer D. F. Warm temperatures or drought during seed maturation increase free α-tocopherol in seeds of soybean (glycine max {L.} Mem) // *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 6058–6063.
71. Talcott S. T., Howard L. R., Brenes C. H. Antioxidant changes and sensory properties of carrot puree processed with and without periderm tissue // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 1315–1321.
72. Tong L. M., Sasaki S., McCelements D. J., Decker E. A. Mechanisms of antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 1473–1478.
73. Decker E. A. Antioxidant mechanisms // *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology* / Akoh C. C., Min D. B. (eds). — New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002. — P. 517–542.
74. Mahoney J. R., Graf E. Role of α-tocoperol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in a model system // *J. Food Sci.*, 1986, 51, p. 1293–1296.
75. Sofos J. N. Use of phosphates in low-sodium meat products // *Food Technol.* 1986, 40, p. 52–57.
76. Liebler D. C. Antioxidant reactions of carotenoids // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992, 691, p. 20–31.
77. Palozza P., Krinksky N. I. Antioxidant effect of carotenoids *in vivo* and *in vitro* — an overview // *Meth. Enzymol.*, 1992, 213, p. 403–420.
78. Kanner J., German J. B., Kinsella J. E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1987, 25, p. 317–364.
79. Porter W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems // *Tox. Indus. Health*, 1993, 9, p. 93–122.
80. Chen H., Lee D. J., Schanus E. G. The inhibitory effect of water on the Co^{2+} and Cu^{2+} catalyzed decomposition of methyl linoleate hydroperoxides // *Lipids*, 1992, 27, p. 234–239.
81. Beuge J. A., Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation // *Meth. Enzymol.*, 1978, 52, p. 302–310.
82. Pegg R. B. Spectrophotometric measurement of secondary lipid oxidation products // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* / Wrolstad R. (ed.). — New York, NY: John Wiley & Sons, 2002. — P. D2.4.1–D2.4.18.
83. Shantha N. C., Decker E. A. Rapid sensitive iron-based spectrophotometric methods for the determination of peroxide values in food lipids // *J. Assoc. Offic. Anal. Chem. Int.* 1994, 77, p. 421–424.
84. Larick D. K., Parker J. D. Chromatographic analysis of secondary lipid oxidation products // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry Chemistry* / Wrolstad R. (ed.). — New York, NY: John Wiley & Sons, 2002. — P. D2.2.1–D2.4.9.

85. Yu T. C., Sinnhuber R. O. An improved 2-thiobarbituric acid (TBA) procedure for measurement of autooxidation in fish oils // *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1967, 44, p. 256–261.
86. Grundy S. M. United States cholesterol guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy // *Am. J. Cardiol.*, 2001, 88, p. 23J–27J.
87. Willet W. C., Stampfer M. J., Manson J. E. et al. Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women // *Lancet*, 1993, 341, p. 581–585.
88. Exler J. Composition of Foods: Finfish and Shellfish Products. — USDA Handbook 8–15. — Washington, DC, 1987.
89. Ha Y. L., Grimm N. K., Pariza M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid // *Carcinogenesis*, 1987, 8, p. 1881–1887.
90. Lee K. N., Kritchevsky D., Pariza M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits // *Atherosclerosis*, 1994, 108, p. 19–25.
91. Park Y., Storkson J. M., Albright K. J., Liu W., Pariza M. W. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice // *Lipids*, 1999, 34, p. 235–241.
92. Quilez J., Garcia-Lorda P., Salas-Salvado J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions // *Clin. Nutr.*, 2003, 22, p. 343–351.
93. Bendich A. From 1989 to 2001: what have we learned about the «biological actions of beta-carotene»? // *J. Nutr.*, 2004, 134, p. 225S–230S.
94. Granado R., Olmedilla B., Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health // *Brit. J. Nutr.*, 2003, 90, p. 487–502.
95. Nguyen M. L., Schwartz S. J. Lycopene: chemical and biological properties // *Food Tech.*, 1999, 53, p. 38–45.

5. АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

Шринивасан Дамодаран (*Srinivasan Damodaran*)
Перевод Н. С. Селивановой под науч. ред. канд. мед. наук В. М. Жминченко

Содержание

5.1. Введение 212
5.2. Физико-химические свойства аминокислот. 214
5.2.1. Общие свойства 214
5.2.1.1. Структура и классификация 214
5.2.1.2. Стереохимия аминокислот . . 216
5.2.1.3. Кислотно-основные свойства аминокислот 216
5.2.1.4. Гидрофобность аминокислот 218
5.2.1.5. Оптические свойства аминокислот. 221
5.2.2. Реакционная способность аминокислот 221
5.3. Структура белка 224
5.3.1. Структурная иерархия белков 224
5.3.1.1. Первичная структура . 224
5.3.1.2. Вторичная структура 226
5.3.1.3. Третичная структура 229
5.3.1.4. Четвертичная структура. . 231
5.3.2. Факторы стабильности структуры белка . . . 232
5.3.2.1. Стерические взаимодействия. 233
5.3.2.2. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. . . 233
5.3.2.3. Водородные связи. 233
5.3.2.4. Электростатические взаимодействия . 234
5.3.2.5. Гидрофобные взаимодействия 235
5.3.2.6. Дисульфидные связи 237
5.3.3. Конформационная стабильность и изменчивость белков 237
5.4. Денатурация белков . . 238
5.4.1. Термодинамика процесса денатурации 239
5.4.2. Денатурирующие факторы . 241
5.4.2.1. Физические факторы. 241
5.4.2.2. Химические факторы. 246
5.5. Функциональные свойства белков 249
5.5.1. Гидратация белка 251
5.5.2. Растворимость 254
5.5.2.1. Значение pH 255
5.5.2.2. Ионная сила 256
5.5.2.3. Температура . . 256
5.5.2.4. Присутствие органических растворителей. 256
5.5.3. Поверхностно-активные свойства белков . . 257
5.5.3.1. Эмульгирующие свойства . . . 260
5.5.3.2. Пенообразующие свойства . . 264
5.5.4. Связывание вкусоароматических веществ. 268
5.5.4.1. Термодинамика взаимодействий белков со вкусоароматическими соединениями . 268
5.5.4.2. Факторы, влияющие на связывание вкусоароматических соединений 270
5.5.5. Вязкость 270

5.5.6. Гелеобразование 272
5.5.7. Текстуризация 275
5.5.7.1. Фильерная текстуризация 275
5.5.7.2. Текстуризация экструзией. 275
5.5.8. Тестообразование ... 276
5.6. Белковые гидролизаты 279
5.6.1. Функциональные свойства белковых гидролизатов 279
5.6.2. Аллергенные свойства ... 281
5.6.3. Горькие пептиды 281
5.7. Нутритивные свойства белков . 281
5.7.1. Качество белка 281
5.7.2. Усвояемость 282
5.7.2.1. Конформация белка. 282
5.7.2.2. Факторы, снижающие биологическую ценность . 284
5.7.2.3. Промышленная переработка 284
5.7.3. Оценка биологической ценности белков ... 285
5.7.3.1. Биологические методы 285
5.7.3.2. Химические методы 286
5.7.3.3. Ферментативные и микробиологические методы 287
5.8. Физические и химические изменения белков при промышленной переработке. Изменения пищевой ценности 287
5.8.1. Изменение пищевого качества белков и образование токсичных соединений 287
5.8.1.1. Влияние умеренной тепловой обработки ... 287
5.8.1.2. Изменения в составе белков при экстракции и фракционировании 288
5.8.1.3. Химические изменения аминокислот .. 289
5.8.1.4. Влияние окислителей 293
5.8.1.5. Реакции карбонильных соединений с аминами .. 297
5.8.1.6. Прочие реакции пищевых белков 299
5.8.2. Изменения функциональных свойств белков ... 301
5.9. Химические и ферментативные модификации белков . 302
5.9.1. Химические модификации ... 302
5.9.1.1. Алкилирование 303
5.9.1.2. Ацилирование 304
5.9.1.3. Фосфорилирование 304
5.9.1.4. Сульфитолизис . 305
5.9.1.5. Этерификация. 306
5.9.2. Ферментативная модификация белков 306
5.9.2.1. Ферментативный гидролиз 306
5.9.2.2. Пластеиновая реакция ... 306
5.9.2.3. Перекрестная сшивка белков 307
Дополнительная литература . 307
Литература ... 307

5.1. Введение

В биологических системах главную роль играют белки. Хотя информация об эволюции и биологической организации клеток содержится в ДНК, химические и биохимические процессы, поддерживающие жизнь клетки и организма, выполняют исключительно ферменты, которых известны уже тысячи. Каждый из них катализирует в клетках высокоспецифическую биологическую реакцию. Кроме функционирования в качестве ферментов, белки (например, коллаген, кератин, эластин и др.) выполняют также функцию структурных компонентов клеток и сложных организмов. Функциональное разнообразие белков обусловлено прежде всего их химическим составом.

Белки — это высокоорганизованные полимеры, состоящие из аминокислот (их насчитывается 21), соединенных замещенными амидными связями. В отличие от гликозидных и фосфодиэфирных связей (соответственно, в полисахаридах и нуклеиновых кислотах), амидная связь в белках является частично двойной, что еще более подчеркивает структурную сложность этих белковых полимеров. Без такой сложности состава мириады биологических функций, выполняемых белками, были бы невозможны — благодаря этой сложности возможно образование множества трехмерных структурных форм, выполняющих различные биологические функции. Чтобы подчеркнуть их биологическую важность, эти макромолекулы были названы протеинами (от греческого слова *proteois,* означающего «первостепенной важности»).

На элементном уровне белки содержат (по массе) 50–55% углерода, 6–7% водорода, 20–23% кислорода, 12–19% азота и 0,2–3,0% серы. Синтез белка осуществляется рибосомами, а после синтеза цитоплазматические ферменты модифицируют некоторые аминокислотные остатки, меняя элементный состав некоторых белков. Белки, не подвергающиеся в клетках ферментативной модификации, называют *гомопротеинами,* а модифицированные белки или белки в комплексе с небелковыми компонентами называют *сопряженными (конъюгированными) протеинами* или *гетеропротеинами.* Небелковые компоненты довольно часто называют *простетическими группами.* К примерам сопряженных белков можно отнести *нуклеопротеины* (рибосомы), *гликопротеины* (овальбумин и каппа-казеин), *фосфопротеины* (α- и β-казеины, киназы и фосфорилазы), *липопротеины* (протеины яичного желтка и несколько протеинов плазмы крови), а также *металлопротеины* (гемоглобин, миоглобин и некоторые ферменты). Глико- и фосфопротеины содержат ковалентно присоединенные соответственно углеводные и фосфатные группы, тогда как другие сопряженные протеины — нековалентные комплексы, содержащие нуклеиновые кислоты, липиды или ионы металлов. Эти комплексы в соответствующих условиях могут диссоциировать.

Белки можно также классифицировать по их грубой структурной организации. Так, *глобулярные белки* существуют в сферической или эллипсоидной формах, образованных накладыванием друг на друга полипептидных цепей. *Фибриллярные белки* — это палочкообразные молекулы со скрученными линейными полипептидными цепями (например, тропомиозин, коллаген, кератин и эластин). Эти белки могут также образовываться в результате линейной агрегации небольших глобулярных белков, в частности, актина и фибрина. Большинство ферментов являются глобулярными белками, а фибриллярные белки функционируют как *структурные белки.*

По биологическим функциям белки можно разделить на категории *ферментных катализаторов, структурных белков, сократительных белков* (миозин, актин и тубулин), *гормонов* (инсулин и гормон роста), *транспортных белков* (сывороточный альбумин, трансферрин и гемоглобин), *антител* (иммуноглобулины), *резервных белков* (яичный альбумин и белки семян растений) и *защитных белков* (токсины и аллергены). Резервные белки присутствуют главным образом в яйцах и семенах растений, являясь источниками азота и аминокислот, необходимых для прорастания семян и развития плода. Защитные белки — это неотъемлемая часть защитных механизмов для выживания конкретных микроорганизмов и животных.

Все белки состоят в основном из одних и тех же 20 базовых аминокислот, но в некоторых белках все они не присутствуют. Различия в структуре и функциях тысяч белков обусловлены последовательностью амидных связей аминокислот друг с другом. Изменением последовательности аминокислот, их типа и соотношения, а также длины цепи полипептидов можно синтезировать буквально миллиарды белков с уникальными свойствами.

Все биологически продуцируемые белки можно использовать в качестве пищевых, однако на практике пищевые белки могут быть легкоусваиваемыми, нетоксичными, нутритивно адекватными, функциональными (используемыми в пищевых продуктах с определенной целью), широкораспространенными или восполняемыми с помощью окультуренных растений. Традиционно основными источниками пищевых белков являются молоко, мясо (в том числе рыб и птицы), яйца, злаковые и бобовые культуры, а также семена масличных растений. В животных и растительных тканях это преимущественно резервные белки, играющие роль источника азота для развивающего зародыша. Из-за повсеместного увеличения численности городского населения необходимо разработать нетрадиционные источники белков для удовлетворения нутритивных потребностей человека. Пригодность таких новых источников белка для использования в производстве пищевых продуктов зависит, однако, от их стоимости и способности выполнять обычные функции белковых ингредиентов в пищевых продуктах (как промышленного производства, так и приготовленных в домашних условиях).

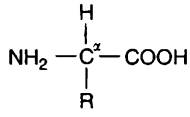
Функциональные свойства белков в пищевых продуктах обусловлены их структурными и другими физико-химическими свойствами. Для повышении роли белков в питании и в условиях конкуренции новых более дешевых источников белка с традиционными необходимо фундаментальное понимание физических, химических, нутритивных и функциональных свойств белков, а также изменений этих свойств в процессе переработки.

5.2. Физико-химические свойства аминокислот

5.2.1. Общие свойства

5.2.1.1. Структура и классификация

Основные структурные единицы белков — это α-аминокислоты, состоящие из α-углеродного атома, ковалентно присоединенного к атому водорода, аминогруппе, карбоксильной группе и боковой группе R (формула 5.1).



(5.1)

Природные белки содержат различные первичные аминокислоты (до 21), соединенные амидными связями. 21-ой, относительно недавно открытой природной аминокислотой является селеноцистеин [12]. Все эти аминокислоты отличаются только по химической природе боковой группы R (рис. 5.1). Физико-химические свойства (электрический заряд, растворимость, реакционная способность и потенциал водородных связей аминокислот) зависят от химической природы R-группы.

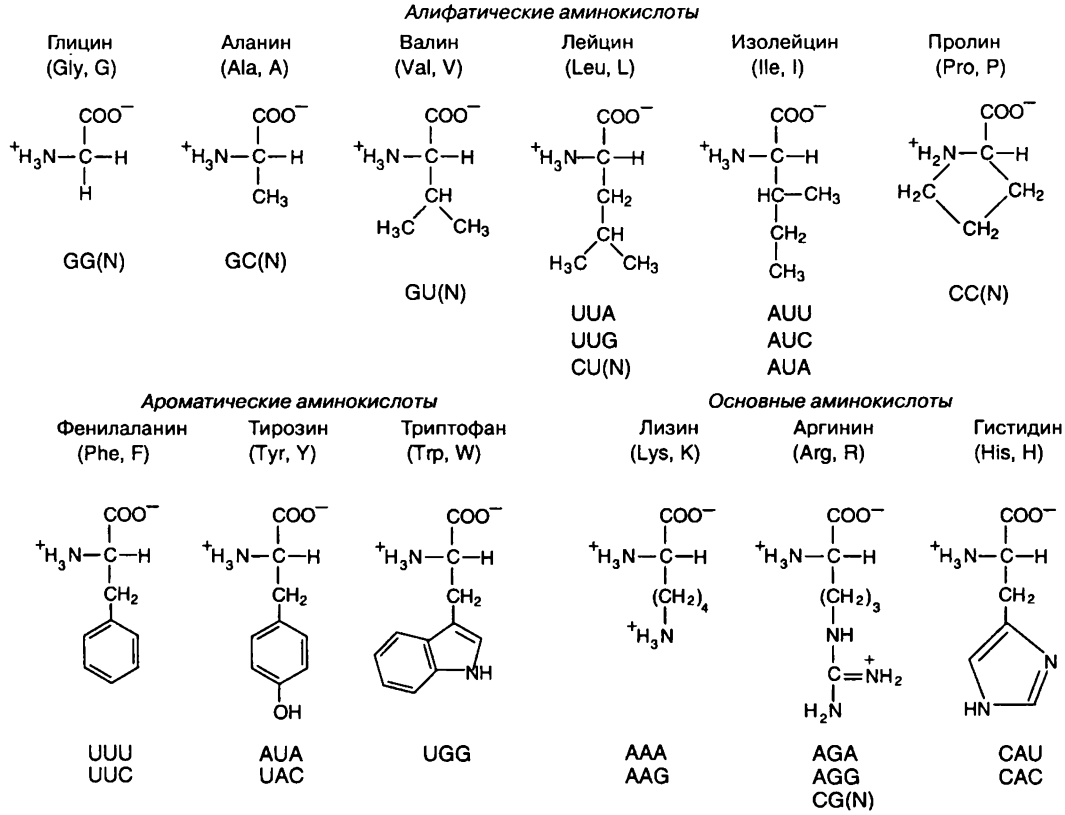


Рис. 5.1. Первичные α-аминокислоты белков. В скобках приведены трех- и однобуквенные обозначения аминокислот. Под каждой формулой указвны коды м-РНК

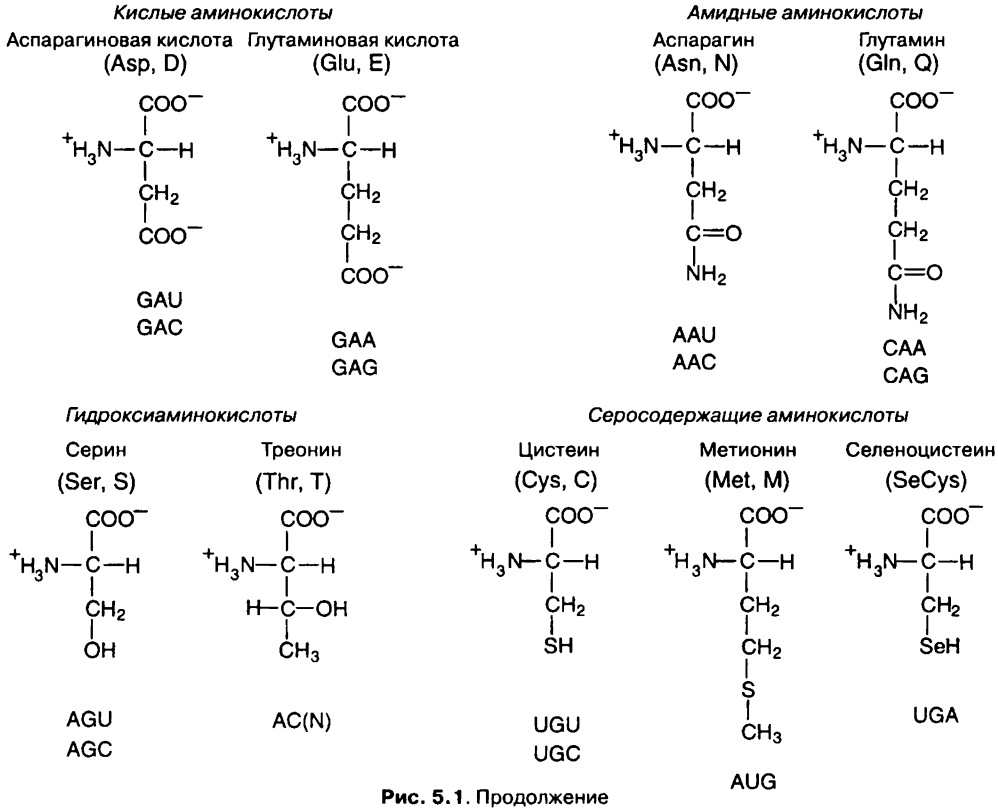
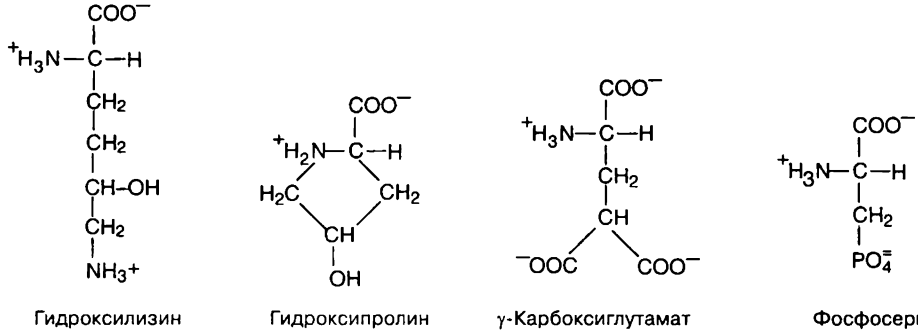


Рис. 5.1. Продолжение

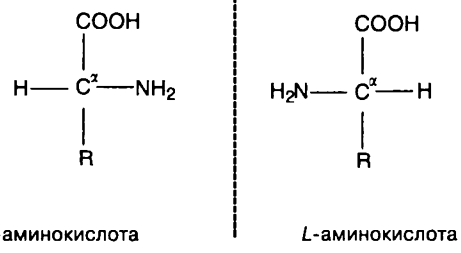
У аминокислот, представленных на рис. 5.1, в том числе у селеноцистеина, есть генетические коды, то есть у каждой из этих аминокислот имеется специфическая т-РНК, транслирующая при синтезе белка генетическую информацию на м-РНК и в аминокислотную последовательность. Помимо первичных аминокислот, представленных на рис. 5.1, в некоторых белках присутствуют и другие типы аминокислот — производных от первичных. Эти *производные аминокислоты* являются или сшитыми, или простыми производными отдельных аминокислот. Белки, содержащие производные аминокислот, называются *сопряженными* (конъюгированными) белками. Хорошим примером сшитой аминокислоты является цистин, присутствующий в большинстве белков. Другие сшитые аминокислоты, в частности, десмозин, изодесмозин, а также ди- и тритирозин обнаружены в структурных белках эластине и резилине. Несколько простых производных аминокислот обнаружены в нескольких белках (например, в коллагене это 4-гидроксипролин и 5-гидроксипролин, являющиеся результатом посттрансляционной модификации при созревании коллагеновых нитей). Фосфосерин и фосфотреонин найдены в нескольких белках, в том числе в казеинах. N-метиллизин присутствует в миозине, а γ-карбоксиглутамат — в некоторых факторах свертывания крови и кальций-связывающих белках (формулы 5.2).



(5.2)

5.2.1.2. Стереохимия аминокислот

За исключением *Gly*, α-углеродный атом всех аминокислот асиметрический, то есть к нему присоединены четыре разные группы. Из-за этого асиметрического центра аминокислоты обладают оптической активностью, а это означает, что плоскость линейно поляризованного света вращается. Кроме асиметрического α-углеродного атома, у *Ile* и *Thr* ассиметрические и β-углеродные атомы, и эти аминокислоты могут существовать в виде четырех энантиомеров. Среди производных аминокислот два асиметрических атома углерода имеют также гидроксипролин и гидроксилизин. Все обнаруженные в природе белки содержат только *L*-аминокислоты. Как правило, *L*- и *D*-энантиомеры представляют согласно формуле (5.3):

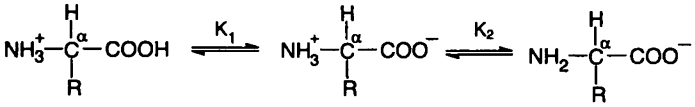


D-аминокислота *L*-аминокислота (5.3)

Эта номенклатура основана на конфигурациях *D*- и *L*-глицеральдегида и не соответствует действительному направлению вращения плоскости поляризации. Так, *L*-конфигурация не обязательно характеризуется левым вращением, как у *L*-глицеральдегида. Фактически у большинства аминокислот правое, а не левое вращение плоскости поляризации.

5.2.1.3. Кислотно-основные свойства аминокислот

Так как аминокислоты содержат кислотную карбоксильную и основную аминогруппу, они ведут себя как кислоты и основания, то есть являются *амфолитами*. Например, простейшая из всех аминокислот *Gly* может существовать в трех различных ионизированных состояниях в зависимости от значения pH раствора (формула 5.4):



(5.4)

При нейтральном значении pH как α-амино, так и α-карбоксильные группы ионизированы, и молекула представляет собой *диполярный* или *цвиттер-ион*. Значение pH, при котором такой диполярный ион электрически нейтрален, называется *изоэлектрической точкой* (pI). Когда цвиттер-ион титруют кислотой, COO^--группа становится протонированной. Значение pH, при котором концентрации COO^- и COOH одинаковы, обозначается pK_{a1} (отрицательный логарифм константы диссоциации кислоты K_{a1}). Аналогичным образом, когда цвиттер-ион титруют основанием, NH_3^+-группа становится депротонированной, и значение pH, при котором $[NH_3^+] = [NH_2]$ обозначается pK_{a2}. Типичная кривая потенциометрического титрования для биполярной аминокислоты приведена на рис. 5.2. Помимо α-амино- и α-карбоксильных групп, ионизируемые группы присутствуют также в боковых цепях *Lys, Arg, His, Asp, Glu, Cys* и *Tyr*. Значения pK_a всех ионизируемых групп в аминокислотах приведены в табл. 5.1. Изоэлектрические точки аминокислот можно определить по значениям pK_{a1}, pK_{a2} и pK_{a3} с помощью следующих формул:

для аминокислот с незаряженной боковой цепью: $pI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2$;

для кислых аминокислот: $pI = (pK_{a1} + pK_{a3})/2$;

для основных аминокислот: $pI = (pK_{a2} + pK_{a3})/2$.

Нижние индексы 1, 2 и 3 относятся соответственно к α-карбоксильным, α-аминным и ионизируемым группам боковых цепей.

В белках α-COOH-группа одной аминокислоты ковалентно соединена с α-NH_2-группой следующей аминокислоты через амидную связь, так что ионизируемыми группами в белках являются N-концевые аминогруппы, С-концевые карбоксильные группы и ионизируемые группы боковых цепей. Значения pK_a ионизируемых групп в белках отличаются от аналогичных значений ионизируемых групп свободных аминокислот (табл. 5.2). Существенный сдвиг значений pK_a в белках по сравнению со свободными аминокислотами обусловлен иным электронным и диэлектрическим окружением указанных групп в белках (это свойство важно для ферментов).

Степень ионизации группы при данном значении pH раствора определяется по уравнению Гендерсона–Хассельбаха:

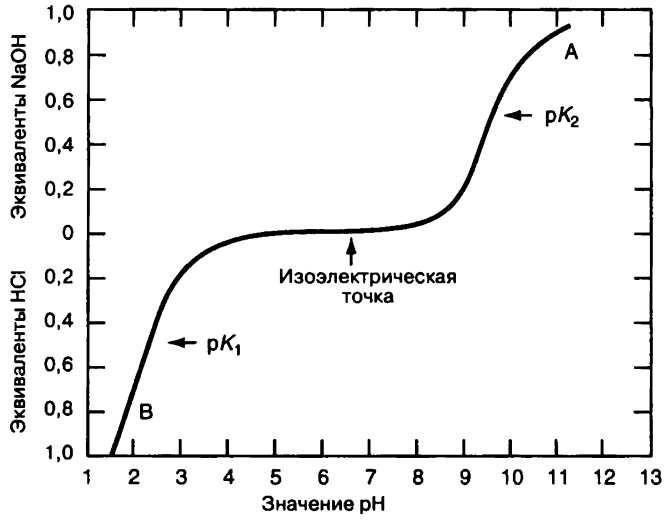


Рис. 5.2. Кривая потенциометрического титрования типичной аминокислоты

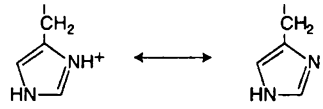
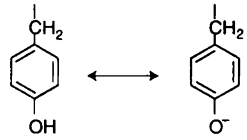
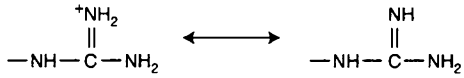
$$pH = pK_a + \log\frac{[\text{Конъюгированное основание}]}{[\text{Конъюгированная кислота}]}. \qquad (5.5)$$

Таблица 5.1

Свойства ионизируемых групп свободных аминокислот при температуре 25 °С

Аминокислота	pK_{a1} (–COOH)	pK_{a2} ($-NH_3^+$)	pK_{a3} (боковая цепь)	pI
Аланин	2,34	9,69		6,00
Аргинин	2,17	9,04	12,48	10,76
Аспарагин	2,02	8,80		5,41
Аспарагиновая кислота	1,88	9,60	3,65	2,77
Цистеин	1,96	10,28	8,18	5,07
Глутамин	2,17	9,13		5,65
Глутаминовая кислота	2.19	9,67	4,25	3,22
Глицин	2,34	9,60		5,98
Гистидин	1,82	9,17	6,00	7,59
Изолейцин	2,36	9,68		6,02
Лейцин	2,30	9,60		5,98
Лизин	2,18	8,95	10,53	9,74
Метионин	2,28	9,21		5,74
Фенилаланин	1,83	9,13		5,48
Пролин	1,94	10,60		6,30
Серин	2,20	9,15		5,68
Треонин	2,21	9,15		5,68
Триптофан	2,38	9,39		5,89
Тирозин	2,20	9,11	10,07	5,66
Валин	2,32	9,62	–	5,96

Таблица 5.2
Средние значения pK_a ионизируемых групп в белках

Ионизируемая группа	pK_a	Кислотная форма <—>Основная форма
Концевая COOH	3,75	–COOH ↔ –COO–
Концевая NH_2	7,8	$–NH_3^+ ↔ –NH_2$
Боковая COOH (Glu, Asp)	4,6	–COOH ↔ –COO–
Боковая NH_2	10,2	–NH3+↔ $–NH_2$
Имидазольная	7,0	
Сульфгидрильная	8,8	–SH ↔ –S–
Фенольная	9,6	
Гуанидильная	> 12	

После определения степени ионизации отдельных ионизируемых групп с помощью уравнения (5.5) можно рассчитать общий заряд белка при данном значении pH, добавив общее число отрицательных и положительных зарядов.

По природе взаимодействия боковых цепей с водой все аминокислоты можно разделить на несколько категорий. Аминокислоты с алифатическими (*Ala, Ile, Leu, Met, Pro* и *Val*) и ароматическими боковыми цепями (*Phe, Trp* и *Tyr*) гидрофобны и поэтому ограниченно растворимы в воде (табл. 5.3). Полярные (гидрофильные) аминокислоты хорошо растворимы в воде, и они либо имеют электрический заряд (*Arg, Asp, Glu, His* и *Lys*), либо не имеют (*Ser, Thr, Asn, Gln* и *Cys*). Боковые цепи *Arg* и *Lys* содержат соответственно гуанидильные и аминогруппы, и тем самым при нейтральном pH они имеют положительный заряд (то есть являются основными). Как основные, так и кислые аминокислоты сильно гидрофильны. Общий заряд белка при физиологических условиях зависит от относительного числа основных и кислотных аминокислотных остатков.

Полярность незаряженных нейтральных аминокислот лежит где-то посередине между гидрофобными и заряженными аминокислотами. Полярная природа *Ser* и *Thr* обусловлена присутствием гидроксильной группы, способной образовывать водородную связь с водой. Так как в *Tyr* также содержится ионизируемая при щелочных значениях pH фенольная группа, *Tyr* считают полярной аминокислотой, однако по характеристикам растворимости при нейтральном значении pH ее следует относить к гидрофобным аминокислотам. Амидная группа *Asn* и *Gln* способна взаимодействовать с водой через образование водородных связей. При кислотном или щелочном гидролизе амидная группа этих аминокислот превращается в карбоксильную с выделением аммиака. Большинство *Cys*-остатков белков присуствует в виде цистина, представляющего собой димер *Cys*, полученный окислением тиольных групп с образованием дисульфидной сшивки.

По своему уникальной аминокислотой является пролин, так как в белках это единственная *иминокислота*. В пролине пропильная боковая цепь ковалентно связана с α-углеродным атомом и α-аминогруппой, образуя циклическую пирролидиновую структуру.

5.2.1.4. Гидрофобность аминокислот

Один из главных факторов, влияющий на такие физико-химические свойства белков и пептидов, как структура, растворимость, способность связывать жиры и т. д. — это гидрофобность составляющих аминокислотных остатков. Гидрофобность можно определить как избыток свободной энергии водного рас-

Таблица 5.3
Свойства аминокислот при температуре 25 °C

Аминокислота	Молекулярная масса	Остаточный объем Δ^3	Остаточная площадь Δ^2	Растворимость, г/дм^3	Гидрофобность, ккал/моль[a] (ΔG^0_{tr})
Ala	89,1	89	115	167,2	0,4
Arg	174,2	173	225	855,6	−1,4
Asn	132,1	111	150	28,5	−0,8
Asp	133,1	114	160	5,0	−1,1
Cys	121,1	109	135		2,1
Gln	146,1	144	180	7,2 (37 °C)	−0,3
Glu	147,1	138	190	8,5	−0,9
Gly	75,1	60	75	249,9	0
His	155,2	153	195		0,2
Ile	131,2	167	175	34,5	2,5
Leu	131,2	167	170	21,7	2,3
Lys	146,2	169	200	739,0	−1,4
Met	149,2	163	185	56,2	1,7
Phe	165,2	190	210	27,6	2,4
Pro	115,1	113	145	620,0	1,0
Ser	105,1	89	115	422,0	−0,1
Thr	119,1	116	140	13,2	0,4
Trp	204,2	228	255	13,6	3,1
Tyr	181,2	194	230	0,4	1,3
Val	117,1	140	155	58,1	1,7

[a] Значения ΔG даны относительно глицина и рассчитаны по коэффициенту распределения боковых звеньев (K_{eq}) между 1-октанолом и водой [41].

твора по сравнению с раствором в органическом растворителе в тех же условиях. Самый прямой и простой способ оценки гидрофобности боковых цепей аминокислот — это экспериментальное определение изменений свободной энергии растворения боковых цепей аминокислот в воде и в органическом растворителе (например, в октаноле или этаноле). Химический потенциал растворенной в воде аминокислоты выражается формулой

$$\mu_{AA,w} = \mu^\circ_{AA,w} + RT\ln\gamma_{AA,w}C_{AA,w}, \tag{5.6}$$

где $\mu_{AA,w}$ — стандартный химический потенциал аминокислоты в водном растворе; $\gamma_{AA,w}$ — коэффициент активности; C_{AA} — концентрация; T — абсолютная температура; R — газовая постоянная.

Химический потенциал аминокислоты, растворенной в органическом растворителе (например, в октаноле) можно выразить как

$$\mu_{AA,ocl} = \mu_{AA,ocl} + RT\ln\gamma_{AA,ocl}C_{AA,ocl}. \tag{5.7}$$

В насыщенных растворах, где $C_{AA,w}$ и $C_{AA,ocl}$ – растворимости в воде и октаноле соответственно, химические потенциалы аминокислоты в воде и октаноле одинаковы:

$$\mu_{AA,w} = \mu_{AA,ocl}. \tag{5.8}$$

Таким образом,

$$\mu^\circ_{AA,ocl} + RT\ln\gamma_{AA,ocl}C_{AA,ocl} = \mu^\circ_{AA,w} + RT\ln\gamma_{AA,w}C_{AA,w}. \tag{5.9}$$

Величина ($\mu_{AA,w} - \mu_{AA,ocl}$), то есть разность стандартных химических потенциалов, возникающих при взаимодействии аминокислоты с октанолом и водой, может быть определена как изменение свободной

энергии ($\Delta G^0_{tr,oct\to w}$) переноса аминокислоты из октанола в воду. Принимая отношение коэффициентов активности за единицу, вышеприведенное выражение можно представить как

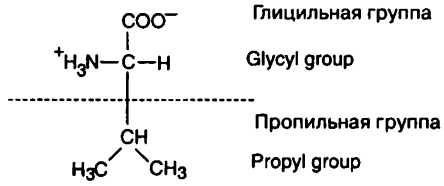
$$\Delta G^0_{tr,(oct\to w)} = -RT\ln(S_{AA,w}/S_{AA,oct}), \tag{5.10}$$

где $S_{AA,oct}$ и $S_{AA,w}$ — соответственно растворимость аминокислоты в октаноле и воде.

Как и все другие термодинамические величины, ΔG^0_{tr} — это аддитивная функция. Так, если в молекуле имеются две ковалентно присоединенные группы *A* и *B*, то ΔG^0_{tr} переноса из одного растворителя в другой представляет собой сумму изменений свободной энергии для переноса групп *A* и *B*, то есть

$$\Delta G^0_{tr,AB} = \Delta G^0_{tr,A} + \Delta G^0_{tr,B}. \tag{5.11}$$

Та же логика применима к переносу аминокислоты из октанола в воду. Например, аминокислоту *Val* можно рассматривать как производное *Gly* с изопропильной боковой цепью при α-углеродном атоме (формула 5.12):



(5.12)

Изменение свободной энергии при переносе валина из октанола в воду можно выразить как

$$\Delta G^0_{tr,Val} = \Delta G^0_{tr,Gly} + \Delta G^0_{tr,\text{бок. цеп}} \tag{5.13}$$

или

$$\Delta G^0_{tr,\text{бок. цеп}} = \Delta G^0_{tr,Val} - \Delta G^0_{tr,Gly}. \tag{5.14}$$

Иными словами, гидрофобность боковых цепей аминокислот можно определить вычитанием $\Delta G^0_{tr,Gly}$ из $\Delta G^0_{tr,Val}$.

Значения гидрофобности боковых цепей аминокислот, полученные таким образом, даны в табл. 5.3. Боковые цепи аминокислот с большими положительными значениями ΔG^0_{tr} гидрофобны, они будут предпочтительно находиться в органической, а не в водной фазе. В белках эти остатки будут локализовываться внутри белка, где полярность окружения та же, что и в органической фазе. Гидрофильные аминокислотные остатки с отрицательными значениями ΔG^0_{tr} локализуются на поверхности белковых молекул. Гидрофобность неполярных остатков линейно коррелирует с площадью их поверхности (рис. 5.3).

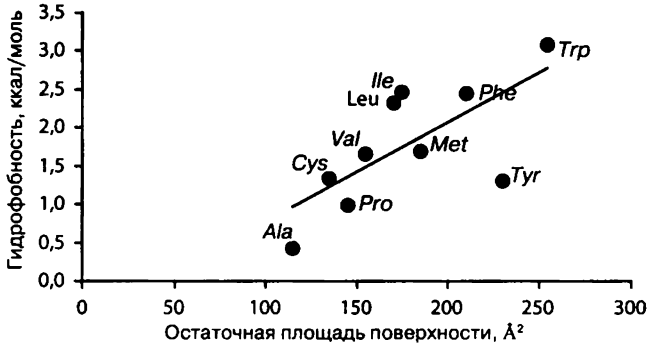


Рис. 5.3. Корреляция между площадью поверхности и гидрофобностью неполярных аминокислотных остатков

5.2.1.5. Оптические свойства аминокислот

Ароматические аминокислоты *Trp, Tyr* и *Phe* поглощают свет в ближнеультрафиолетовой области спектра (длина волны 250–300 нм). Кроме того, *Trp* и *Tyr* в ультрафиолетовой области проявляют флуоресценцию. Максимальные длины волн поглощения и флуоресцентной эмиссии ароматических аминокислот приведены в табл. 5.4. Эти аминокислотные остатки отвечают за способность белков поглощать УФ-излучение в области 250–300 нм с максимумом поглощения для большинства белков при длине волны около 280 нм. Поскольку абсорбционные и флуоресцентные свойства этих аминокислот зависят от полярности их окружения, изменения оптических свойств белков зачастую используется для контроля конформационных изменений в белках.

Таблица 5.4
Спектры ультрафиолетового поглощения и флуоресценции ароматических аминокислот

Аминокислота	λ_{max} абсорбции, нм	Молярный коэффициент экстинкции, (дм³/(моль·см))	λ_{max} флуоресценции, нм
Фенилаланин	260	190	282[a]
Триптофан	278	5500	348[b]
Тирозин	275	1340	304[b]

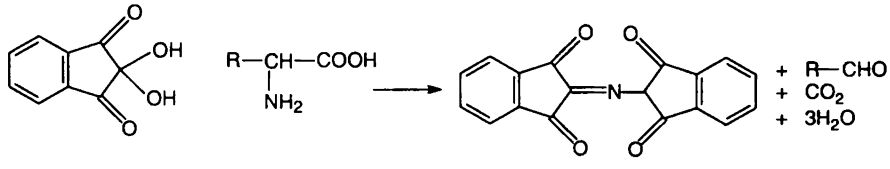
[a] Возбуждение при 260 нм.
[b] Возбуждение при 280 нм.

5.2.2. Реакционная способность аминокислот

Реакционноспособные группы (амино-, карбоксильная, сульфгидрильная, фенольная, гидроксильная, тиоэфирная (*Met*), имидазольная и гуанидиновая) свободных аминокислот и белков способны вступать в химические реакции, словно они присоединены к небольшим органическим молекулам. Типичные реакции для различных групп боковой цепи представлены в табл. 5.5. Некоторые из этих реакций можно использовать для изменения гидрофильных и гидрофобных свойств, а также функциональных свойств белков и пептидов. Отдельные реакции можно использовать и для количественного определения аминокислот и некоторых аминокислотных остатков в белках. Например, для количественного определения аминокислот обычно используют реакцию аминокислот с нингидрином, о-фталевым диальдегидом или флуорескамином.

Реакция с нингидрином

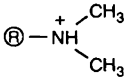
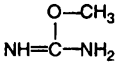
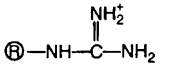
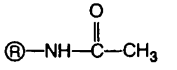
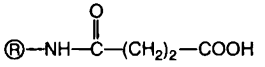
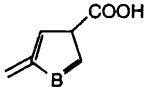
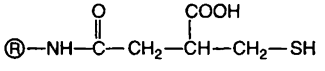
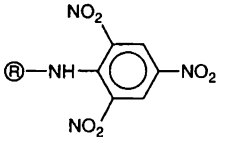
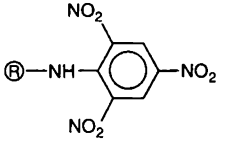
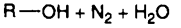
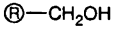
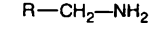
Для количественного определения свободных аминокислот зачастую используют реакцию с нингидрином. При реакции аминокислоты с избыточным количеством нингидрина на каждый моль прореагировавшей кислоты образуется по 1 молю аммиака, альдегида, CO_2 и гидриндантина (уравнение 5.15). Выделившийся аммиак затем вступает в реакцию с 1 молем нингидрина и 1 молем гидриндантина, образуя продукт пурпурного цвета, известный как «пурпурный Ругеманна», с максимальным поглощением при длине волны 570 нм. Пролин и гидроксипролин дают продукт желтого цвета с максимальным поглощением при 440 нм. Эти реакции окрашивания обеспечивают основу для колориметрического определения аминокислот.



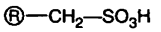
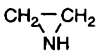
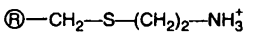
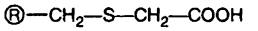
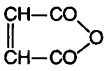
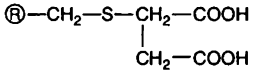
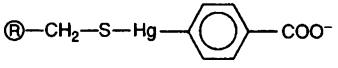
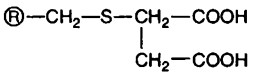
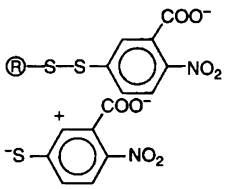
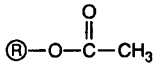
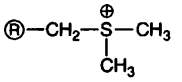
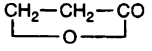
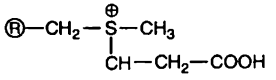
(5.15)

Реакцию с нингидрином обычно используют для определения аминокислотного состава белков. Белок сначала гидролизуется до аминокислот, и свободные аминокислоты затем разделяют и идентифицируют методами ионообменной или гидрофобной хроматографии. Элюаты с колонки реагируют с нингидрином, и количество аминокислот определяют по величине поглощения при длинах волн 570 и 440 нм.

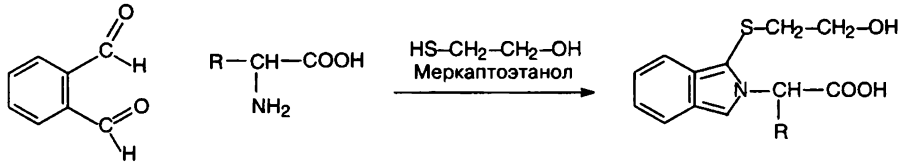
Таблица 5.5
Реакции функциональных групп аминокислот и белков

Тип реакции	Реагент или условия	Продукт реакции	Примечания
А. Аминогруппы			
1. Восстановительное алкилирование	HCHO, $NaBH_4$ (формальдегид)		Полезно для радиоактивно меченых белков
2. Гуанидирование			Превращает боковые цепи лизина в гомоаргинин
	О-метилизомочевина, pH 10,6, 4 °C в течение 4 сут		
3. Ацетилирование	Уксусный ангидрид		Удаляет положительный заряд
4. Сукцинирование	Янтарный ангидрид		Придает отрицательный заряд остаткам лизина
5. Тиолирование			Удаляет положительный заряд и вводит тиольную группу в остатки лизина
	тиопараконовая кислота		
6. Арилирование	1-фторо-2,4-динитробензол (*FDNB*)		Используется для определения аминогрупп
	2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота (*TNBS*)		Коэффициент экстинкции 1,1 10^4 $M^{-1}·см^{-1}$ при 367 нм; применяется для определения реакционоспособных остатков лизина в белках
7. Дезаминирование	1,5 M $NaNO_2$ в уксусной кислоте, 0 °C		
Б. Карбоксильные группы			
1. Этерификация	Кислота в метаноле		Гидролиз эфира происходит при pH > 6,0
2. Восстановление	Борогидрид в тетрагидрофуране, трифторуксусная кислота		
3. Декарбоксилирование	Воздействие кислоты, щелочи, нагревания		Происходит только с аминокислотами, но не с белками

В. Сульфгидрильные группы

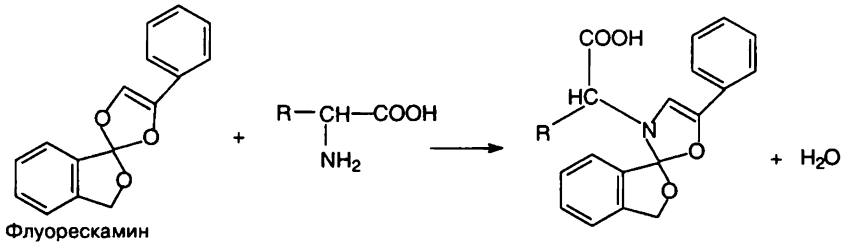
1. Окисление	Пермуравьиная кислота		
2. Блокирование	 этиленимин		Вводит аминогруппу
	Йодуксусная кислота		Вводит одну аминогруппу
	 (малеиновый ангидрид)		Вводит два отрицательных заряда на каждую заблокированную SH-группу
	p-Меркуробензоат		Коэффициент экстинкции данного производного при 250 нм (pH 7) составляет 7500 $M^{-1}\cdot см^{-1}$; данная реакция используется для определения содержания SH-групп в белках
	N-Этилмалеимид		Используется для блокировки SH-групп
	5,5'-Дитио-бис-2-нитробензойная кислота (*DTNB*)	 (тионитробензоат)	Выделяется 1 моль тионитробензоата, его 412 составляет 13 600 $M^{-1}\cdot см^{-1}$; данная реакция используется для определения SH-групп в белках
Г. Серин и треонин			
1. Этерификация	CH_3-COCl		
Д. Метионин			
1. Алкилгалогениды	CH_3I		
2. β-пропиолактон			

Реакция с О-фталевым диальдегидом. При реакции аминокислот с О-фталевым диальдегидом (1,2-бензолдикарбональ) в присутствии 2-меркаптоэтанола (уравнение 5.16) образуется сильно флуоресцирующее производное с максимумом возбуждения при 380 нм и максимуме флуоресценции при 450 нм.



(5.16)

Реакция с флуорескамином. При реакции аминокислот, пептидов и белков с первичными аминами (уравнение 5.17) образуется сильно флуоресцирующее производное с максимумом флуоресценции при 475 нм (при возбуждении при длине волны 390 нм). Данный метод применим для количественного определения аминокислот, белков и пептидов.



(5.17)

5.3. Структура белка

5.3.1. Структурная иерархия белков

Существует четыре структурных уровня белка: первичный, вторичный, третичный и четвертичный.

5.3.1.1. Первичная структура

Первичная структура белка отражает линейную последовательность, в которой составляющие белок аминокислоты ковалентно соединены амидными связями, называемые также пептидными. Такая пептидная связь образуется конденсацией α-карбоксильной группы *i*-й аминокислоты и α-аминогруппы (*i*+ l)-й аминокислоты с удалением молекулы воды. В такой линейной последовательности все аминокислотные остатки находятся в *L*-конфигурации. В белке с *n* аминокислотных остатков содержится *n*–1 пептидных связей (уравнение 5.18).



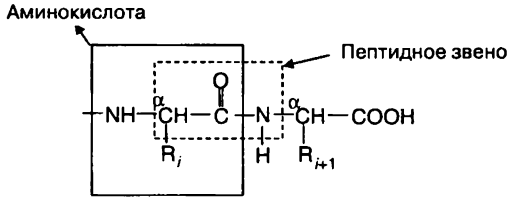
(5.18)

Конец со свободной α-аминогруппой называют N-концом, а конец со свободной α-COOH-группой — С-концом. Когда приводится информация по первичной структуре, то принято считать, что полипептидная цепь начинается с N-конца, а заканчивается С-концом.

Длина цепи (*n*) и последовательность, в которой соединены *n* остатков, определяют физико-химические, структурные и биологические свойства, а также функции белка. Аминокислотная последовательность вы-

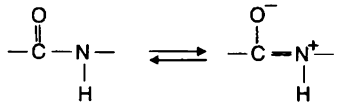
ступает своего рода кодом при образовании вторичной и третичной структур и однозначно определяет биологические функции белка. Молекулярная масса варьирует от нескольких тысяч дальтон (Да) до более миллиона Да. Например, титин, представляющий собой одноцепочечный белок, обнаруженный в мышечной ткани, имеет молекулярную массу более 1 млн Да, а секретин — около 2300 Да. Молекулярная масса большинства белков находится в интервале от 20 000 до 100 000 Да.

Каркас полипептидов можно представить в виде повторяющихся звеньев —N—C—C^{α}— или —$^{\alpha}$C—C—N. Запись —NH—$^{\alpha}$CHR—CO— относится к аминокислотному остатку, а —$^{\alpha}$CHR—CO—NH— — к *пептидному звену* (уравнение 5.19).



(5.19)

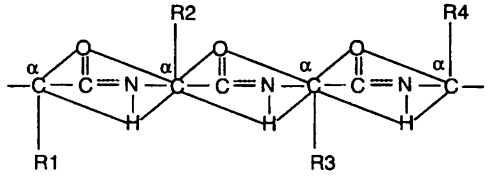
Несмотря на то что связь CO—NH изображена как одинарная ковалентная связь, в действительности у нее частично двойной характер из-за резонансной структуры вследствие делокализации электронов (уравнение 5.20).



(5.20)



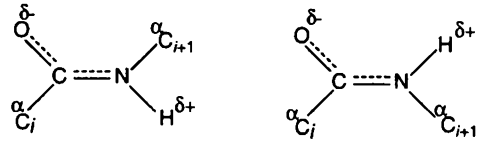
Это предполагает важные структурные особенности белков. Во-первых, резонансная структура препятствует протонированию пептидной N—H-группы. Во-вторых, из-за частично двойного характера пептидной связи вращение связи CO—NH ограничено максимально до ω-угла в 6° Из-за этого ограничения каждый шестиатомный сегмент (—C^{α}—CO—NH—C^{α}—) пептидного каркаса лежит в своей плоскости. Полипептидный каркас можно представить в виде последовательности (—C^{α}—CO—NH—C^{α}—)-плоскостей, присоединенных, как показано в формуле (5.21), к C^{α} атомам:



(5.21)

Так как на долю пептидных связей приходится около трети от общего числа ковалентных связей углеродного каркаса, ограничение их свободного вращения резко понижает гибкость последнего. Свободой вращения обладают лишь связи N—C^{α} и C^{α}—C, и это свобода определяется соответственно диэдральными углами ϕ (фи) и ψ (пси), которые называют также торсионными углами главной цепи. В-третьих, делокализация электронов придает атому кислорода карбонильной группы частичный отрицательный заряд, а атому водорода N—H группы — частичный положительный заряд. По этой причине при подходящих условиях возможна водородная связь (диполь-дипольное взаимодействие) между C=O- и N—H-группами пептидного каркаса.

Другое следствие частично-двойной природы пептидной связи заключается в том, что четыре атома, присоединенных к пептидной связи, могут находиться в *цис-* или *транс*-конфигурации (формула 5.22).



Транс-конфигурация *Цис*-конфигурация (5.22)

Почти все пептидные связи в белках находятся в *транс*-конфигурации, что обусловлено большей термодинамической стабильностью *транс*-конфигурации по сравнению с *цис*-конфигурацией. Так как при переходе от *транс*- к *цис*-конфигурации свободная энергия пептидной связи увеличивается на 8,3 ккал/моль, изомеризации пептидных связей в белках не происходит. Единственное исключение — это пептидные связи с остатками пролина. Поскольку изменение свободной энергии при переходе от *транс*- к *цис*-конфигурации в пептидных связях, содержащих остатки пролина, составляет лишь около 1,86 ккал/моль, то при высоких температурах они иногда претерпевают изомеризацию *транс*- > *цис*-.

Хотя N—C^{α}- и C^{α}—C-связи являются истинными простыми связями, а значение диэдральных углов N и P при свободном вращении может теоретически составлять 360°, в действительности свободное вращение ограничено стерическими препятствиями атомов боковых групп. Это ограничение дополнительно уменьшает гибкость полипептидной цепи.

5.3.1.2. Вторичная структура

Термин «вторичная структура» относится к периодическому пространственному расположению аминокислотных остатков на определенных сегментах полипептидной цепи. Периодическая структура возникает, когда последовательность аминокислотных остатков в сегменте имеет повторяющийся набор торсионных углов ϕ и ψ. Поворот указанных углов происходит под влиянием соседних или близкодействующих нековалентных взаимодействий между боковыми цепями аминокислот, что приводит к локальному уменьшению свободной энергии. *Непериодическая* или *случайная* структура возникает в тех областях полипептидной цепи, в которых последовательность аминокислотных остатков имеет различные значения торсионных углов ϕ и ψ.

У белков выявлены две формы периодических (регулярных) структур — спиральные (геликальные) и протяженные слоистые (листоподобные) структуры. Геометрические характеристики различных регулярных структур белков приведены в табл. 5.6.

Спиральные структуры. Спиральные структуры белков образуются, когда торсионные углы ϕ и ψ аминокислотной последовательности имеют один и тот же набор значений. Путем подбора различных комбинаций углов ϕ и ψ теоретически возможно построить несколько типов спиральных структур различной геометрии, однако в белках выявлены лишь три типа спиралей (геликсов): α-, 3_{10}– и β-спирали.

Из этих трех типов спиралей наиболее распространена у белков α-спираль, наиболее стабильная (рис. 5.4). Высота витка («шаг») этой спирали, то есть увеличение аксиальной длины при вращении, составляет 5,4 Å. На каждый виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, причем каждый остаток

Таблица 5.6

Геометрические характеристики регулярных полипептидных конформаций. По [22]

Структура	ϕ	ψ	n	r	h, Å	t
Правовращающая α-спираль (α-геликс)	−58°	−47°	3,6	13	1,5	100°
π-геликс	−57°	−70°	4,4	16	1,15	81,8°
3_{10}-геликс	−49°	−26°	3	10	2	120°
Параллельный β-слой	−119°	+113°	2		3,2	—
Антипараллельный β-слой	−139°	+135°	2		3,4	—
Полипролин I (*цис*)	−83°	+158°	3,33	1,9	—	—
Полипролин II (*транс*)	−78°	+149°	3,00	3,12		—

Обозначения: ϕ и ψ — диэдральные углы связей соответственно N—Cα и Cα—C связей; n — число остатков на виток; r — число атомов каркаса внутри зафиксированной водородными связями петли спирали; h — подъем спирали на один аминокислотный остаток; $t = 360°/n$, то есть изгиб спирали на один остаток.

удлиняет спираль на 1,5 Å. Угол между остатками составляет 100° (360°/3,6). Боковые цепи аминокислот ориентированы перпендикулярно оси спирали.

α-Спираль стабилизирована водородными связями. Каждая N—H группа связана водородными связями с C=O группой *n*—4 аминокислотного остатка (четвертого предшествующего). В этой зафиксированной водородными связями петле находятся тринадцать атомов каркаса, в связи с чем α-спираль иногда называют $3,6_{13}$ спиралью (см. рис. 5.4). Водородные связи ориентированы параллельно оси спирали, причем N-, H- и O-атомы водородной связи располагаются на одной прямой, то есть угол водородной связи равен практически нулю. Длина водородной связи, то есть расстояние N—H • • • O составляет 2,9 Å, а прочность этой связи —4,5 ккал/моль. α-Спирали могут быть право- и левовращающими (правовращающая спираль более стабильна).

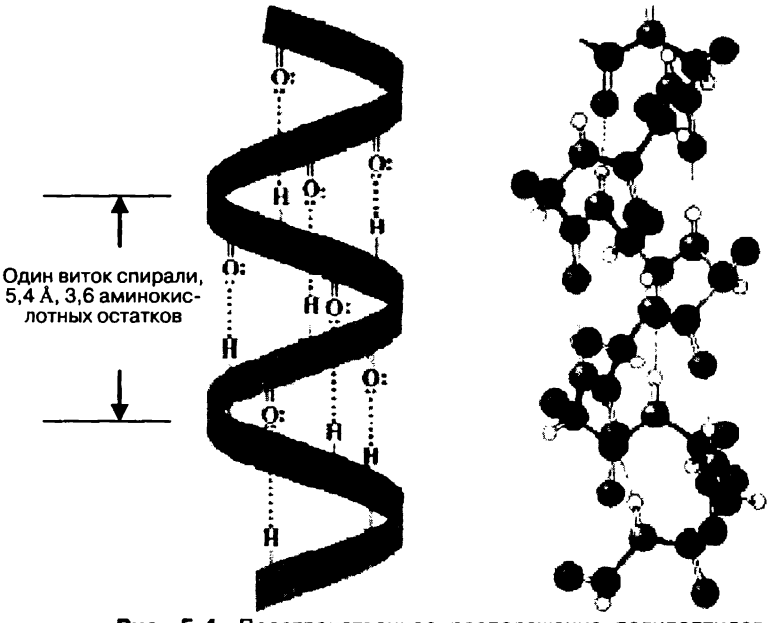


Рис. 5.4. Пространственное расположение полипептидов в α-спирали. По *http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha_helix*

Особенности образования α-спирали заданы двоичным кодом аминокислотной последовательности [61], который кодирует расположение полярных и неполярных остатков последовательности. Полипептидные сегменты с повторяющимися семью аминокислотными последовательностями (гептетами) —P—N—P—P—N—N—P—, где P и N — соответственно полярные и неполярные остатки, легко образуют α-спирали в водных растворах. Образование α-спирали обусловлено именно двоичным кодом, а не точным воспроизведением гептетной последовательности. Допускаются небольшие вариации в двоичном коде данного гептета, обеспечивающие иные меж- и внутримолекулярные взаимодействия, которые способствуют образованию α-спирали. Например, мышечный белок тропомиозин существует полностью в палочкоподобной форме спирализованных участков α-спирали, и его повторяющаяся гептетная последовательность —N—P—P—N—P—P—P— несколько отличается от вышеприведенной последовательности. Несмотря на эту особенность, тропомиозин существует полностью в форме α-спирали из-за других стабилизирующих взаимодействий в спиралеподобной палочке [82].

Большинство выявленных в белках α-спиральных структур по своей природе амфифильны, то есть половина поверхности спирали занята гидрофобными остатками, а вторая половина — гидрофильными (рис. 5.5) [13]. В большинстве белков неполярная поверхность спирали обращена внутрь молекулы белка и, как правило, участвует в гидрофобных взаимодействиях с другими неполярными поверхностями.

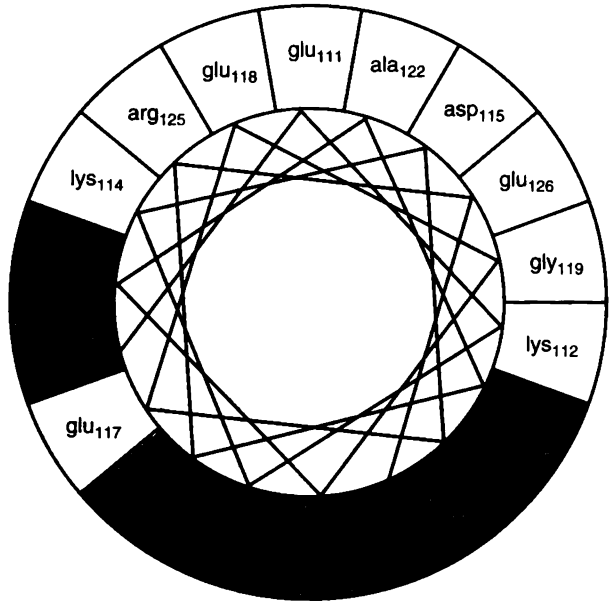


Рис. 5.5. Схематическое представление структуры остатков 110–127 бычьего гормона роста (в поперечном разрезе). Верхняя незаштрихованная часть колеса представляет гидрофильную поверхность, а заштрихованная нижняя — гидрофобную поверхность амфифильной спирали. По [13]

К другим типам спиральных структур белков относятся β-спираль и 3_{10}-спираль. Свободная энергия этих спиралей составляет соответственно около 0,5 и 1,0 ккал/моль, и они менее стабильны, чем α-спираль. Эти спирали существуют лишь в виде коротких сегментов с несколькими аминокислотными остатками, и в большинстве белков они не играют какой-либо особой роли.

В аминокислотных остатках пролина из-за кольцевой структуры, образованной ковалентным присоединением к аминогруппе пропильной боковой цепи, вращение вокруг связи N—C^{α} невозможно, вследствие чего угол ϕ имеет фиксированное значение 70°. Кроме того, из-за отсутствия атома водорода при атоме азота невозможно образование водородных связей. По этим двум причинам сегменты с остатками пролина не способны образовывать α-спиралей. Фактически пролин можно считать «разрушителем» α-спирали. Белки с высоким содержанием остатков пролина склонны образовывать случайную (или непериодическую) структуру. Например, у β-казеина остатки пролина составляют около 17% общего числа аминокислотных остатков, а у α_{s1}-казеина — 8,5% , и за счет равномерного распределения этих остатков в первичной структуре таких белков α-спирали отсутствуют, а их структура неупорядочена. Вместе с тем полипролин может образовывать два типа спиралей — *полипролин* I и *полипролин* II. У полипролина I пептидные связи находятся в *цис*-конфигурации, а у полипролина II — в *транс*-конфигурации. Другие геометрические характеристики этих спиралей приведены выше в табл. 5.6. Коллаген, наиболее распространенный животный белок, существует в виде спирали типа полипролина II. У коллагена, как правило, каждый третий остаток — это глицин, которому обычно предшествует остаток пролина, а три полипептидных цепи сплетены в тройную спираль, и ее стабильность обеспечивается межцепочечными водородными связями. Именно эта уникальная структура тройной спирали обеспечивает высокую прочность коллагена на разрыв.

Структура β-слоя. *β-слой* — это протяженная структура со специфической геометрией, приведенной в табл. 5.6. В этой протяженной структуре группы C=O и N—H ориентированы перпендикулярно направлению цепи, в связи с чем образование водородных связей возможно только между отдельными сегментами, но не в рамках одного сегмента. Длина β-нити складывается примерно из 5–15 аминокислотных остатков. У белков две β-нити одной молекулы взаимодействуют через водородные связи, образуя структуру так называемого β-складчатого слоя. В структуре такого слоя боковые цепи ориентированы перпендикулярно (выше и ниже) его плоскости. В зависимости от направления ориентации нитей N → C могут формироваться два типа β-складчатых слоев: *параллельный* и *антипараллельный* (рис. 5.6). В параллельном β-слое направления β-нитей совпадают друг с другом, а в антипараллельном противоположны по направлению. Эти различия в направлениях цепи влияют на геометрию водородных связей. В антипараллельных β-слоях атомы N—H O расположены на одной прямой (при нулевом угле H-связи), что повышает стабильность водородной связи, тогда как в параллельных β-слоях они расположены под углом, что снижает стабильность последней. Именно поэтому антипараллельные β-слои стабильнее параллельных.

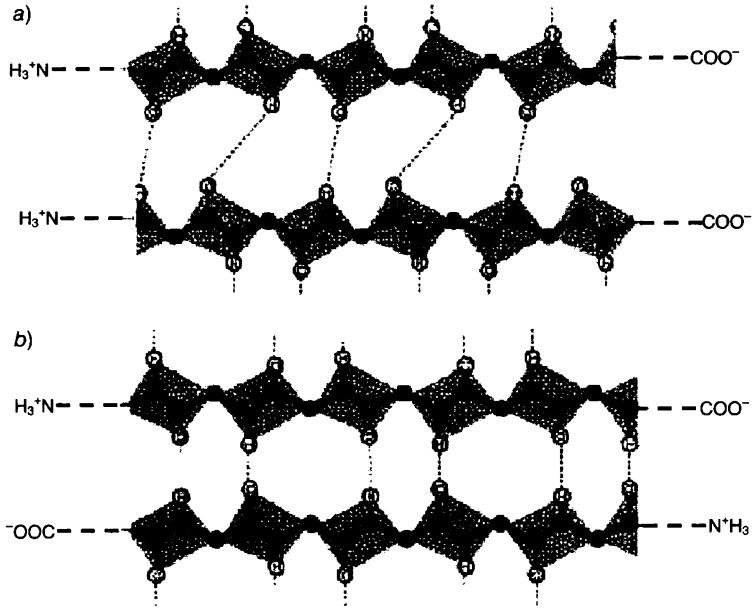


Рис. 5.6. Структура параллельных (*a*) и антипараллельных (*b*) β-слоев. Точками обозначены водородные связи между пептидными группами. Боковые цепи при C^{α}-атомах ориентированы перпендикулярно (вверх или вниз) относит ельно каркаса. По http://www.schoolscience.co.uk

Двоичным кодом, определяющим образование структур β-слоев у белков, является —N—P—N—P—N—P—N—P—. Высокую склонность к образованию структур β-слоя имеют полипептидные

сегменты с чередующимися полярными и неполярными остатками. Тенденцию к образованию структуры β-слоя имеют также сегменты, богатые гидрофобными боковыми цепями типа Val и Ile. Как и можно было бы ожидать, в этом коде допускаются некоторые вариации.

Структура β-слоя обычно стабильнее структуры α-спирали. Белки с преобладанием структур типа β-слоя обычно характеризуются высокими температурами денатурации, примерами чего могут служить β-лактоглобулин (51% структур типа β-слоя) и соевый глобулин 11S (64% структур типа β-слоя), температуры денатурации которых составляют соответственно 75,6 и 84,5 °С, тогда как температура денатурации бычьего сывороточного альбумина (*BSA*) с 64% α-спирализованной структуры составляет лишь 64 °С [25, 27]. При нагревании и охлаждении растворов α-спиралевидных белков α-спираль обычно преобразуется в β-слой [27] (обратного превращения у белков не наблюдается).

К еще одной распространенной структуре белков относится «β-изгиб» («β-шпилька»). Эта структура возникает в результате поворота полипептидной цепи, образующей β-слой, на 180°. Обычно β-изгиб включает сегмент из четырех остатков, накладывающихся друг на друга и стабилизированных водородной связью. В β-изгибах обычно встречаются остатки *Asp*, *Cys*, *Asn*, *Gly*, *Tyr* и *Pro*. Вторичная структура нескольких белков представлена в табл. 5.7.

Таблица 5.7

Содержание вторичной структуры отдельных глобулярных белков[a] (по разным источникам)

Белок	Содержание α-спиралей, %	Содержание β-слоев, %	Содержание β-шпилек, %	Содержание апериодических структур, %
Деоксигемоглобин	85,7	0	8,8	5,5
Бычий сывороточный альбумин	67,0	0	0	33,0
α_{s1}-Казеин	15,0	12,0	19,0	54,0
β-Казеин	12,0	14,0	17,0	57,0
к-Казеин	23,0	31,0	14,0	32,0
Химотрипсиноген	11,0	49,4	21,2	18,4
Иммуноглобулин G	2,5	67,2	17,8	12,5
Инсулин (димер)	60,8	14,7	10,8	15,7
Ингибитор бычьего трипсина	25,9	44,8	8,8	20,5
Рибонуклеаза А	22,6	46,0	18,5	12,9
Яичный лизоцим	45,7	19,4	22,5	12,4
Овомукоид	26,0	46,0	10,0	18,0
Овальбумин	49,0	13,0	14,0	24,0
Папаин	27,8	29,2	24,5	18,5
α-Лактальбумин	26,0	14,0	0	60,0
β-Лактоглобулин	6,8	51,2	10,5	31,5
Соевый белок 11S	8,5	64,5	0	27,0
Соевый белок 7S	6,0	62,5	2,0	29,5
Фазеолин	10,5	50,5	11,5	27,5
Миоглобин	79,0	0	5,0	16,0

[a] Приведенные в таблице значения соответствуют процентному содержанию от общего числа аминокислотных остатков.

5.3.1.3. Третичная структура

Третичная структура описывает пространственное расположение белковой молекулы, когда линейная белковая цепь с сегментами вторичной структуры складывается в более компактную трехмерную форму. Третичные структуры β-лактоглобулина и фазеолина (резервный белок обычной пищевой фасоли) приведены на рис. 5.7 [74, 98].

Трансформация белка из линейной формы (первичная структура) в компактную третичную структуру — процесс довольно сложный. На молекулярном уровне детали образования третичной структуры заложены в аминокислотной последовательности. С термодинамической точки зрения формирование третичной

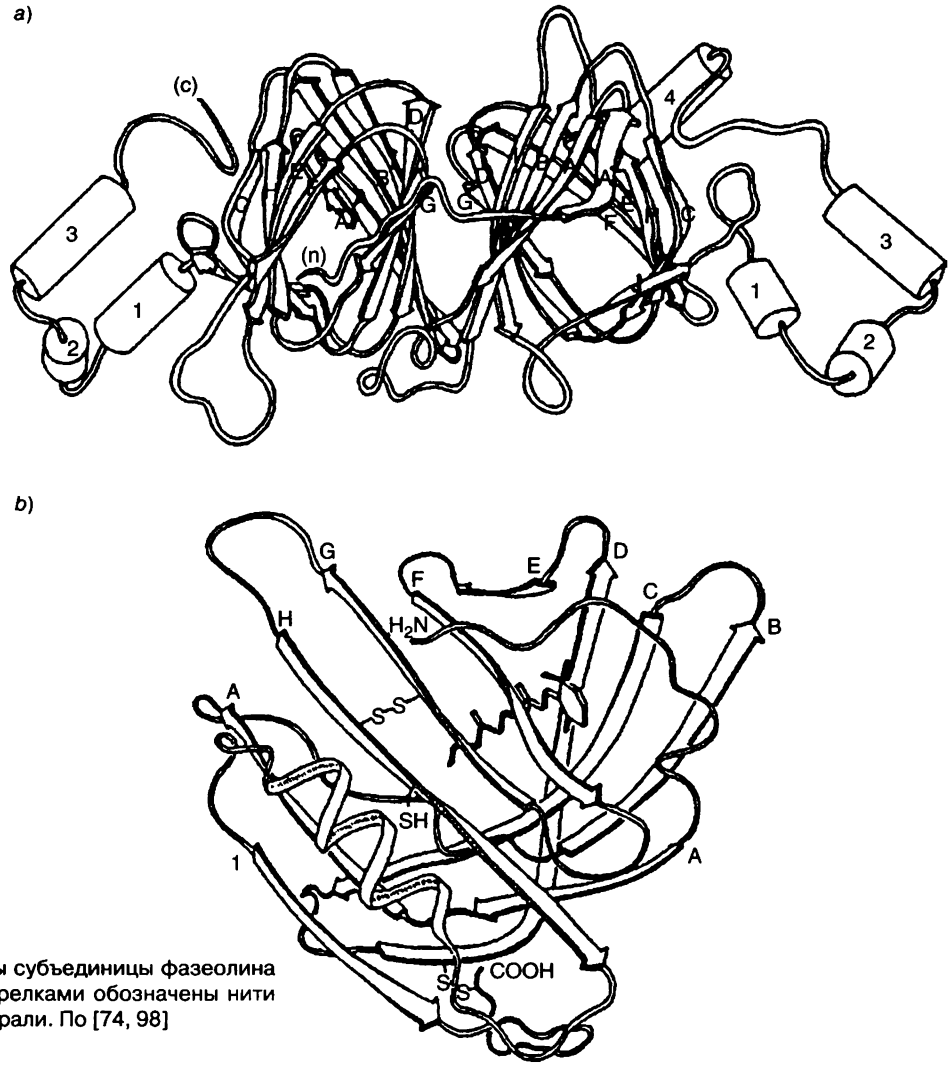


Рис. 5.7. Третичные структуры субъединицы фазеолина (*a*) и β-лактоглобулина (*b*). Стрелками обозначены нити β-слоев, а цилиндрами — α-спирали. По [74, 98]

структуры включает оптимизацию различных взаимодействий (гидрофобного, электростатического, Ван-дер-Ваальсового и водородного связываний) между различными группами белков и конформационной энтропии полипептидной цепи, так что суммарная свободная энергия молекулы снижается до минимально возможного значения. Важнейшей конформационной перестройкой, приводящей к снижению свободной энергии при формировании третичной структуры, является переориентация большинства гидрофобных остатков по направлению от водного окружения внутрь белковой структуры, а гидрофильных остатков, особенно несущих электрический заряд, — по направлению к границе раздела «белок–вода». Несмотря на сильную общую тенденцию гидрофобных остатков к «заглублению» в белковое окружение, она, как правило, наблюдается лишь частично из-за стерических затруднений. Фактически в большинстве глобулярных белков неполярные остатки занимают около 40–50% доступной для воды поверхности белковых молекул [84]. Некоторые полярные группы неминуемо «заглублены» внутри белковых молекул, но и они обязательно образуют водородные связи с другими полярными группами так, что их свободная энергия минимизирована неполярным окружением внутренней части белка. Соотношение неполярных и полярных участков поверхности белковой молекулы существенно влияет на некоторые физико-химические свойства белка.

Фолдинг («складывание») белка из линейной в компактную третичную структуру сопровождается уменьшением площади поверхности контакта белка с водой. *Доступная площадь поверхности* белка опре-

деляется как общая площадь поверхности раздела фаз в трехмерном пространстве, занятом белком, которую можно представить как результат «прокатывания» сферической молекулы воды радиусом 1,4 Å по всей поверхности молекулы белка. Для нативных глобулярных белков [84] доступная площадь контакта (Å^2) — это простая функция их молекулярной массы M:

$$A_s = 6{,}3M^{0{,}73}. \tag{5.23}$$

Общая доступная площадь контакта полипептида в «растянутом» состоянии (то есть без вторичной, третичной или четвертичной структуры) также коррелирует с молекулярной массой [84]:

$$A_t = 1{,}48M + 21. \tag{5.24}$$

Начальная площадь поверхности белка, «сложенного» при образовании глобулярной третичной структуры, — A_b, то есть площадь «заглубленных», остатков можно определить по уравнениям (5.23) и (5.24).

Соотношение и распределение гидрофильных и гидрофобных остатков в первичной структуре влияет на ряд физико-химических свойств белка. Например, форма белковой молекулы диктуется его аминокислотной последовательностью. Если у белка много гидрофильных остатков, распределенных в последовательности равномерно, то он примет вытянутую или палочкообразную форму. Это обусловлено тем, что при данной массе у вытянутой формы больше отношение площади поверхности к объему и больше гидрофильных остатков помещается на поверхности. С другой стороны, если в белке много гидрофобных остатков, то он принимает глобулярную (примерно сферическую) форму, благодаря чему минимизируется отношение площади поверхности к объему. Это позволяет большему числу гидрофобных остатков «заглубиться» внутрь молекулы белка. Для глобулярных белков существует общая закономерность: в крупных молекулах содержится бо́льшая доля неполярных аминокислот, чем в мелких.

Третичные структуры некоторых низкомолекулярных белков строятся из доменов. Домены — это области полипептидной последовательности, независимо образующие третичную структуру, то есть по сути это «мини-белки» конкретного белка. Стабильность структуры каждого домена, как правило, независима от других. В большинстве низкомолекулярных белков домены образуются независимо и затем взаимодействуют друг с другом с образованием уникальной третичной структуры. У некоторых белков, в частности у фазеолина (рис. 5.7), в третичной структуре может присутствовать два и более отдельных домена (структурных единиц), соединенных сегментом полипептидной цепи. Число доменов у белка, как правило, зависит от его молекулярной массы. Небольшие белки (например, лизоцим, β-лактоглобулин и α-лактальбумин) со 100–150 аминокислотными остатками обычно образуют однодоменную третичную структуру. Крупные белки типа иммуноглобулина содержат несколько доменов. Легкая цепь иммуноглобулина G состоит из двух доменов, а тяжелая — из четырех. Эти домены состоят примерно из 120 аминокислотных остатков. Человеческий сывороточный альбумин, состоящий из 585 аминокислотных остатков, имеет три гомологичных домена, в каждом из которых содержатся два субдомена [56].

5.3.1.4. Четвертичная структура

Четвертичная структура касается пространственного расположения белка с более чем одной полипептидной цепью. Некоторые биологически важные белки существуют как димеры, тримеры, тетрамеры и т. д. Любой из этих четвертичных комплексов, называемых олигомерами, может быть построен из белковых субъединиц (мономеров), которые могут быть одинаковыми (гомогенными) или разными (гетерогенными). Например, β-лактоглобулин в диапазоне pH 5–8 существует как димер, при pH 3–5 — как октомер, а при pH выше 8 — как мономер, причем мономерные единицы этих комплексов идентичны. С другой стороны, гемоглобин — это тетрамер, построенный из двух различных полипептидных цепей (α и β).

Образование олигомерных структур —результат специфических межбелковых взаимодействий. Движущими силами такого образования являются в первую очередь нековалентные взаимодействия — водородное связывание, гидрофобные и электростатические взаимодействия. Гидрофобные аминокислоты усиливают тенденцию к образованию олигомерных белков, причем у белков с более 30% остатков гидрофобных аминокислот лучше проявляется тенденция к образованию олигомерных структур, чем у белков с меньшей долей таких аминокислотных остатков.

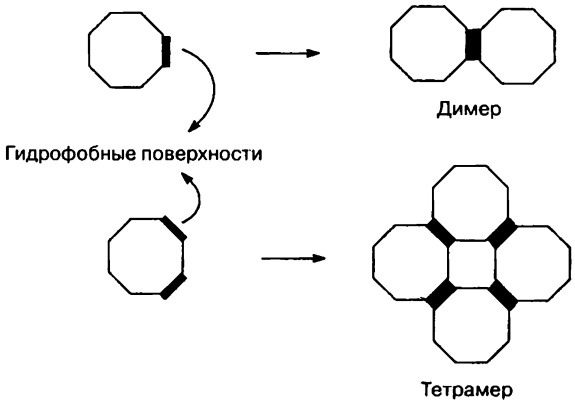


Рис. 5.8. Схематическое представление образования в белках димеров и олигомеров

Образование четвертичной структуры происходит в первую очередь под влиянием термодинамического фактора в целях «заглубления» внутрь гидрофобных поверхностей субъединиц. Если доля гидрофобных аминокислотных остатков в белках превышает 30%, то физически невозможно образовать такую третичную структуру, которая бы «заглубила» все неполярные остатки, и существует большая вероятность присутствия гидрофобных участков на поверхности молекулы. В результате их взаимодействия с соседними мономерами образуются димеры, тримеры и т. д. (рис. 5.8).

Многие пищевые белки, особенно злаковых культур, существуют в виде олигомеров с различными полипептидами. Как и следовало ожидать, в этих белках обычно более 35% гидрофобных аминокислотных остатков (*Ile, Leu, Trp, Tyr, Val, Phe* и *Pro*). Кроме того, в этих белках содержится 6–12% пролина [15]. Как следствие, белки злаковых культур существуют в составе сложных олигомерных структур. Основные резервные белки сои — β-конглицин и глицинин — содержат соответственно около 41 и 39% гидрофобных аминокислотных остатков. β-Конглицин — это белок-тример, состоящий из трех различных субъединиц, причем для него обнаружено явление сложной зависимости «ассоциации–диссоциации» как функции ионной силы и значения pH [89, 123]. Глицинин состоит из 12 субъединиц, шесть из которых — кислые, а шесть — основные. Каждая из основных субъединиц перекрестно сшита дисульфидной связью с кислой субъединицей. Шесть этих кислотно-основных пар удерживаются в виде олигомера нековалентными взаимодействиями. Сложная зависимость «ассоциации–диссоциации» от ионной силы характерна и для глицинина [89].

У олигомерных белков доступная площадь поверхности A_s коррелирует с молекулярной массой [84]:

$$A_s = 5{,}3M^{0{,}76}. \tag{5.25}$$

Это соотношение отличается от соотношения для мономерных белков. Площадь «заглубленной» поверхности при формировании нативной олигомерной структуры из составных полипептидных субъединиц можно расситать по уравнению:

$$A_b = A_t - A_s = (1{,}48M + 21) - 5{,}3M^{0{,}76}, \tag{5.26}$$

где A_t – общая доступная площадь полипептидных субъединиц в полностью «растянутом» состоянии.

5.3.2. Факторы стабильности структуры белка

Процесс фолдинга полипептидной цепи в уникальную трехмерную структуру довольно сложен. Как мы уже отмечали, нативная конформация белка определяется (кодируется) его аминокислотной последовательностью. В 1960-х гг. Анфинсен (*Anfinsen*) с коллегами показали, что при добавлении денатурированной рибонуклеазы к физиологическому буферному раствору происходит восстановление ее нативной конформации и она проявляет почти 100% своей биологической активности. Впоследствии было показано, что аналогично ведут себя ряд ферментов. Медленнная, но спонтанная трансформация от ненативной конформации к нативной ускоряется некоторыми внутримолекулярными нековалентными взаимодействиями. Нативная конформация белка — это термодинамическое состояние, при котором реализуются максимально энергетически выгодные взаимодействия, а невыгодные сводятся к минимуму. Силы, участвующие в фолдинге белка, можно разделить на внутримолекулярные взаимодействия, связанные только со строением молекулы белка, и внутримолекулярные взаимодействия, вызванные окружающим молекулы растворителем. Ван-дер-Ваальсовы и стерические взаимодействия молекулы относятся к первым, а водородное связывание, электростатические и гидрофобные взаимодействия — ко вторым.

5.3.2.1. Стерические взаимодействия

Хотя углы ϕ и ψ теоретически могут поворачиваться на 360°, их значения существенно ограничены стерическими препятствиями, создаваемыми атомами боковой цепи. Из-за этого сегменты полипептидной цепи могут принимать ограниченное число конфигураций. Искажение планарной геометрии пептидной единицы, растягивание и сгибание связей приводит к увеличению свободной энергии молекулы, в связи с чем фолдинг полипептидной цепи может осуществляться только так, чтобы не происходило деформации связей и углов между ними.

5.3.2.2. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия

Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия — это индуцированные диполь-дипольные взаимодействия между нейтральными атомами молекулы белка. При сближении двух атомов каждый из них индуцирует в другом диполь путем поляризации электронной оболочки. Взаимодействие между такими индуцированными диполями характеризуется как притяжением, так и отталкиванием, причем величины этих сил зависят от межатомного расстояния. Энгергия притяжения обратно пропорциональна межатомному расстоянию в шестой степени, а энергия отталкивания — в двенадцатой степени. Для межатомного расстояния r результирующая энергия взаимодействия двух атомов вычисляется по функции потенциальной энергии:

$$E_{\text{Вдв}} = E_a + E_r = \frac{A}{r^6} + \frac{B}{r^{12}}, \tag{5.27}$$

где A и B — константы для данной пары атомов; E_a и E_r — соответственно, энергии притяжения и отталкивания.

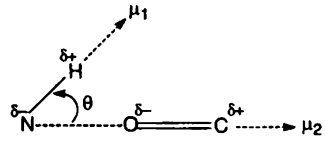
Ван-дер-ваальсовы взаимодействия очень слабы, быстро уменьшаются с расстоянием и на расстоянии более 6 Å практически исчезают. Энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий для различных пар атомов варьирует от –0,04 до –0,19 ккал/моль. Вместе с тем у белков, где в Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия вовлечены множество пар атомов, суммарный их вклад в фолдинг белка и его стабильность довольно велик.

5.3.2.3. Водородные связи

Водородные связи включают взаимодействие атома водорода, ковалентно присоединенного к атому с отрицательным зарядом (N, O или S), с другим атомом с отрицательным зарядом. Схематически водородная связь можно представить как $D—H \cdot\cdot\cdot A$, где D и A — соответственно, донорный и акцепторный атомы с отрицательным зарядом. Сила водородной связи варьирует от 2 до 7,9 ккал/моль в зависимости от пары взаимодействующих электроотрицательных атомов и угла связи.

У белков имеется несколько групп, способных образовывать водородные связи, и некоторые из них представлены на рис. 5.9 [113]. Среди этих групп наибольшее число водородных связей образуется в структурах α-спирали и β-слоя между N—H- и C=O-группами пептидных связей.

Водородную связь пептида можно рассматривать как сильное постоянное диполь-дипольное взаимодействие между диполями $N^{\delta-}—H^{\delta+}$ и $C^{\delta+}=O^{\delta-}$:



(5.28)

Сила водородной связи рассчитывается по уравнению потенциальной энергии:

$$E_{\text{Н-связи}} = \frac{\mu_1 \mu_2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r^3} \cos\theta, \tag{5.29}$$

где μ_1 и μ_2 — дипольные моменты; ε_0 — электрическая постоянная (по старой терминологии — диэлектрическая проницаемость вакуума); ε – диэлектрическая постоянная среды; r — межатомное расстояние между атомами с отрицательным зарядом; θ — угол водородной связи.

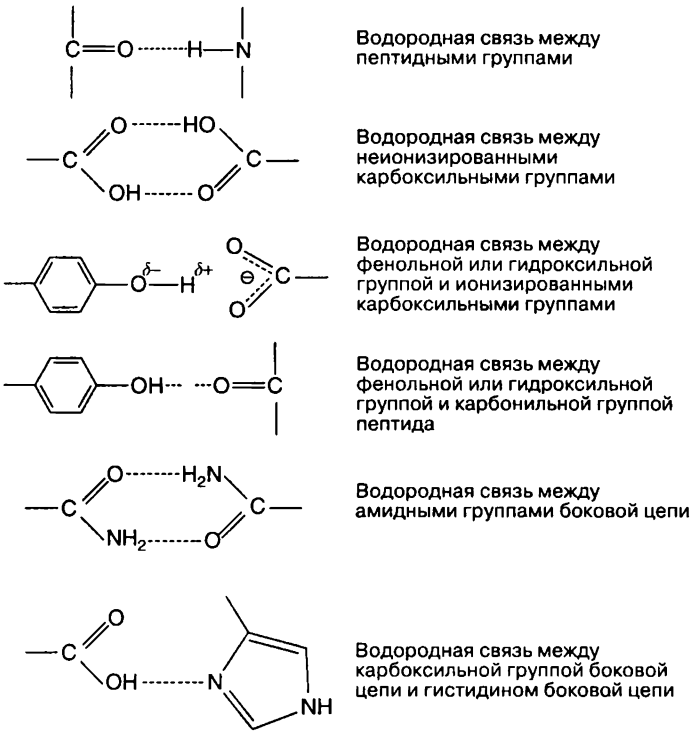


Рис. 5.9. Белковые группы, образующие водородную связь. По [113]

Энергия водородной связи прямо пропорциональна произведению дипольных моментов и косинусу угла связи и обратно пропорциональна третьей степени расстояния N • O и диэлектрической постоянной среды. Эта энергия максимальна при $\theta = 0$ и принимает нулевое значение при $\theta = 90°$ Водородные связи в α-спирали и антипараллельных структурах β-слоя имеют значение θ, очень близкое к нулю, тогда как в параллельных β-слоях значения θ намного больше. Оптимальное расстояние N • O для максимальной энергии водородной связи составляет 2,9 Å. На более коротких расстояниях силы электростатического отталкивания между атомами $N^{\delta-}$ и $O^{\delta-}$ вызывают значительное уменьшение энергии водородной связи. Энергия водородных связей N—H • • O=C у белков с диэлектрической постоянной, близкой к 1, составляет обычно около 4,5 ккал/моль. «Сила» связи — это количества энергии, необходимое для ее разрыва.

Существование в белках водородных связей неоспоримо. Поскольку образование каждой водородной связи уменьшает свободную энергию белка примерно на –4,5 ккал/моль, то обычно считается, что они не только играют ведущую роль в фолдинге белка, но и могут во многом определять стабильность нативной структуры. Вместе с тем, этот вывод является дискуссионным. Так как за образование водородных связей вода может конкурировать с N—H и C=O- группами белков, водородное связывание между этими группами не может возникать спонтанно, как и образование N—H • O=C-водородных связей быть движущей силой для образования в белках α-спирали и β-слоев. Водородное связывание — это преимущественно ионное взаимодействие. Как и для других ионных взаимодействий, стабильность водородной связи зависит от диэлектрической постоянной окружающей среды. Стабильность водородных связей во вторичных структурах обусловлена преимущественно низкой диэлектрической проницаемостью из-за взаимодействия между неполярными остатками. Громоздкие боковые цепи предотвращают доступ воды к N—H • O=C-водородным связям, которые стабильны постольку, поскольку защищены от контакта с водой.

5.3.2.4. Электростатические взаимодействия

Как мы уже отмечали, белки содержат несколько аминокислотных остатков с ионизируемыми группами. При нейтральных значениях pH остатки *Asp* и *Glu* заряжены отрицательно, а *Lys, Arg* и *His* — положительно. При щелочных значения pH остатки *Cys* и *Tyr* приобретают отрицательный заряд.

В зависимости от относительного числа отрицательно и положительно заряженных остатков белки при нейтральном pH имеют отрицательный или положительный заряд. Значение pH, при котором заряд белка равен нулю, называется *изоэлектрической точкой* (pI). Изоэлектрическая точка отличается от *изоионной точки,* которая равна значению pH раствора белка, в котором отсутствуют электролиты. Изоэлектрическую точку белка можно определить по аминокислотному составу и значениям pK_a ионизируемых групп по уравнению Гендерсона–Хассельбаха (см. уравнение 5.5).

За несколькими исключениями почти все заряженные группы белков расположены на поверхности белковой молекулы. Так как при нейтральных значениях pH белки имеют положительный или отрицательный заряд, то можно ожидать, что силы отталкивания одноименных зарядов будет дестабилизировать структуру белка, а притяжение противоположно заряженных групп в определенных критических положе-

ниях должно стабилизировать его структуру. Вместе с тем, в действительности силы такого отталкивания или притяжения в водных растворах минимальны из-за высокой диэлектрической проницаемости воды. Энергия электростатического взаимодействия двух фиксированных зарядов q_1 и q_2, находящихся на расстоянии r, вычисляется по уравнению

$$E_{эл} = \pm\frac{q_1 q_2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r}. \quad (5.30)$$

В вакууме или в воздухе ($\varepsilon = 1$) энергия электростатического взаимодействия двух зарядов, находящихся на расстоянии 3–5 Å, составляет примерно от ± 110 до ±66 ккал/моль, но в воде эта энергия снижается до ± 1,4... ±0,84 ккал/моль, то есть до порядка энергии теплового движения белковой молекулы при температуре 37 °С. Поэтому притягивающие и отталкивающие электростатические взаимодействия зарядов на поверхности молекулы белка не вносят существенного вклада в ее стабильность. Заряженные группы, «заглубленные» внутрь белковой молекулы, где диэлектрическая проницаемость меньше, чем у воды, обычно образуют солевые мостики с высокой энергией взаимодействия. Так, энергия электростатического взаимодействия в зависимости от расстояния и локальной диэлектрической проницаемости может составлять от ±0,84 до ±110 ккал/моль.

Хотя электростатические взаимодействия могут и не играть основной роли в фолдинге белка, склонность заряженных групп оставаться подверженными действию водного окружения определенно влияют на способность молекулы к фолдингу.

5.3.2.5. Гидрофобные взаимодействия

Из вышеизложенного должно быть очевидно, что в водных растворах образование водородных связей и электростатические взаимодействия между различными полярными группами полипептидной цепи не обеспечивают достаточного количества энергии, чтобы играть главную роль в фолдинге белка. Эти полярные взаимодействия в белках в водном окружении не слишком стабильны, причем их стабильность зависит от присутствия неполярного окружения. Главная движущая сила фолдинга — это гидрофобные взаимодействия неполярных групп.

В водных растворах гидрофобное взаимодействие между неполярными группами является результатом термодинамически невыгодного взаимодействия между водой и неполярными группами. Когда углеводород растворен в воде, стандартное изменение энергии (ΔG) положительно, а изменение объема (ΔV) и энтальпии (ΔH) — отрицательно. Несмотря на отрицательное значение ΔH, то есть термодинамически выгодное взаимодействие между водой и углеводородом, значение ΔG положительно. Так как $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (где T — температура, а ΔS — изменение энтропии), из-за большого отрицательного изменения энтропии, сводящего на нет положительное изменение ΔH, должно происходить положительное изменение ΔG. Уменьшение энтропии обусловлено образованием вокруг углеводорода клатратной или «коробчатой» водной структуры. Из-за положительного изменения ΔG взаимодействие между водой и неполярными группами сильно ограничено, то есть в водных растворах неполярные группы имеют тенденцию к агрегации и площадь прямого контакта с водой минимальна (см. главу 2). Это индуцированное структурой воды взаимодействие между неполярными группами в водных растворах называют гидрофобным взаимодействием. В белках гидрофобное взаимодействие между неполярными боковыми цепями аминокислотных остатков является главной причиной того, что белки «складываются» в уникальные третичные структуры, в которых большинство неполярных групп удалены из водного окружения.

Так как гидрофобное взаимодействие по сути противоположно растворению неполярных групп в воде, то ΔG для гидробофного взаимодействия отрицательно, а ΔV, ΔH и ΔS — положительны. В отличие от других нековалентных взаимодействий гидрофобные взаимодействия эндотермичны, то есть при высоких температурах они сильнее, а при низких — слабее (в отличие от энергии водородного связывания). Изменение гидрофобной свободной энергии с температурой обычно подчиняется квадратичной функции:

$$\Delta G_{Hф} = a + bT + cT^2, \quad (5.31)$$

где a, b и с — константы; T — абсолютная температура.

Энергию гидрофобного взаимодействия между двумя сферическими неполярными молекулами можно рассчитать по уравнению потенциальной энергии [59]:

$$E'_{\text{Нф}} = -20\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} e^{-D/D_0} \text{ ккал/моль}, \quad (5.32)$$

где R_1 и R_2 — радиусы неполярных молекул; D —расстояние в между ними (нм); D_0 – длина полного затухания взмодействия (1 нм).

В отличие от электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, а также водородного связывания, являющихся степенной зависимостью от расстояния между взаимодействующими группами, гидрофобное взаимодействие — это экспоненциальная зависимость от расстояния между ними. Таким образом, она действует на сравнительно больших расстояниях (например, 10 нм).

Свободную энергию гидрофобного взаимодействия белков невозможно рассчитать по приведенному выше уравнению из-за участия в нем ряда неполярных групп. Вместе с тем оценить свободную энергию гидрофобного взаимодействия белка можно с помощью эмпирических корреляций. Свободная энергия гидрофобного взаимодействия молекулы прямо пропорциональна неполярной площади, доступной воде поверхности (рис. 5.10) [107]. Константа пропорциональности, то есть наклон прямой, составляет от 22 кал/(моль·Å²) для *Ala, Val, Leu и Phe* до 26 кал/(моль·Å²) для боковых цепей *Ser, Thr, Trp* и *Met*. В среднем гидрофобность боковых цепей аминокислот составляет около 24 кал/(моль·Å²), что близко к значению 25 кал/(моль·Å²) для алканов. Это означает, что при удалении из водного окружения каждого квадратного ангстрема площади неполярной поверхности белок уменьшает свою свободную энергию примерно на 24 кал/моль. Таким образом, свободную энергию гидрофобного взаимодействия белка можно оценить путем простого умножения всей «заглубленной» площади поверхности на 24 кал/(моль·Å²).

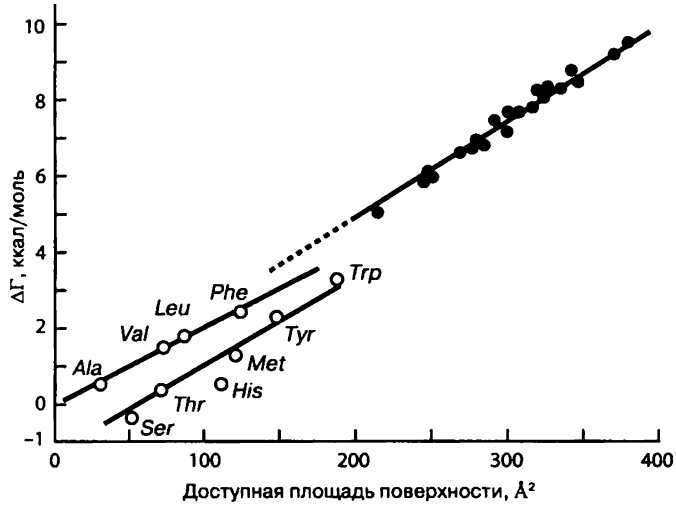


Рис. 5.10. Взаимосвязь между гидрофобностью и доступной площадью поверхности боковых цепей аминокислот (обозначенных белыми кружками) и углеводородов (обозначенных черными кружками). По [107]

Площадь «заглубленной» поверхности ряда глобулярных белков и оценочные значения свободной энергии гидрофобного взаимодействия приведены в табл. 5.8 [11]. Очевидно, что

Таблица 5.8

Доступная площадь поверхности (A_s), «заглубленная» площадь поверхности (A_b) и свободная энергия гидрофобного взаимодействия белков

Белок	Молекулярная масса, Да	A_s, Å²	A_b, Å²	$\Delta G_{\text{Нф}}$, ккал/моль
Парвальбумин	11 450	5930	11 037	269
Цитохром *C*	11930	5570	12 107	294
Рибонуклеаза А	13690	6790	13 492	329
Лизоцим	14700	6620	15 157	369
Миоглобин	17300	7600	18 025	439
Ретинолсвязывающий белок	20050	9160	20 535	500
Папаин	23 270	9140	25 320	617
Химотрипсин	25 030	10 440	26 625	648
Субтилизин	27 540	10 390	30 390	739
Углеродная ангидраза В	28 370	11 020	30 988	755
Карбоксипептидаза А	34 450	12 110	38 897	947
Термолизин	34 500	12 650	38 431	935

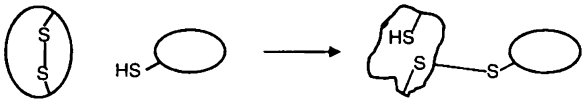
Примечание. Значения A_s приводятся по работе [84], а A_b рассчитаны по уравнениям (5.22) и (5.23).

свободная энергия гидрофобного взаимодействия вносит значительный вклад в стабильность белковой структуры. Среднее значение свободной энергии гидрофобного взаимодействия в расчете на 1 аминокислотный остаток у глобулярных белков составляет 2,5 ккал/моль.

5.3.2.6. Дисульфидные связи

Дисульфидные связи — это единственные ковалентные поперечные связи между боковыми цепями белков. Они могут быть как внутримолекулярными, так и межмолекулярными. В мономерных белках дисульфидные связи образуются в результате фолдинга белка. Когда два *Cys*-остатка сближаются при соответствующей ориентации, окисление сульфгидрильных групп молекулярным кислородом приводит к образованию дисульфидной связи. Однажды образовавшись, дисульфидные связи способствуют стабилизации складчатой структуры белков.

Смеси белков, содержащие остатки цистина и *Cys*, способны подвергаться реакциям сульфгидрильно-дисульфидного обмена:



(5.33)

Такие реакции взаимного обмена могут также происходить в одном денатурированном белке, если в нем присутствуют три сульфгидрильные группы и дисульфидная связь. Эти реакции взаимообмена зачастую приводят к снижению стабильности белковой молекулы.

В целом образование уникальной трехмерной структуры является суммарным результатом действия нековалентных взаимодействий сил притяжения и отталкивания и ковалентных дисульфидных связей.

5.3.3. Конформационная стабильность и изменчивость белков

Стабильность нативной белковой структуры определяется как разница в свободной энергии между нативным и денатурированным («раскрученным») состоянием и обозначается обычно как ΔG_D. Это значение представляет собой количество энергии, необходимое для «раскручивания» белка из нативного состояния до денатурированного.

Все описанные выше нековалентные взаимодействия (за исключением сил электростатического отталкивания) вносят свой вклад в стабильность нативной белковой структуры. Стабилизирующее влияние на нативную структуру изменения общей свободной энергии этих взаимодействий оценивается в сотни ккал/моль, однако общее значение ΔG_D большинства белков составляет порядка 5–20 ккал/моль. Основной фактор дестабилизации нативной структуры — это конформационная энтропия полипептидной цепи. Потери поступательного, вращательного и колебательного движения, происходящие при свертывании разупорядоченной полипептидной цепи в более компактную структуру, уменьшают ее конформационную энтропию. В результате увеличивается свободная энергия, оказывающаяся большей, чем компенсирующие предпочтительные нековалентные взаимодействия, и в целом свободная энергия уменьшается. Таким образом, разница в свободной энергии между нативным и денатурированным состоянием белка может быть рассчитана как:

$$\Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta G_{\text{Н-связи}} + \Delta G_{\text{Эл}} + \Delta G_{\text{Нф}} + \Delta G_{\text{Вдв}} - T\Delta S_{\text{конф}}, \quad (5.34)$$

где $\Delta G_{\text{Н-связи}}$, $\Delta G_{\text{Эл}}$, $\Delta G_{\text{Нф}}$ и $\Delta G_{\text{Вдв}}$ — это соответственно изменение свободной энергии водородной связи, электростатических, гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий; $\Delta S_{\text{конф}}$ — конформационная энтропия полипептидной цепи. $\Delta S_{\text{конф}}$ белка в «раскрученном» состоянии составляет около 1,9–10 кал/(моль·К) на один остаток. Обычно принимают среднее значение 5,2 кал/(моль·К). Белок со 100 аминокислотными остатками при 300 К будет характеризоваться конформационной энтропией в 5,2 100 310 = 161,2 ккал/моль. Эта дестабилизирующая составляющая будет уменьшать общую стабильность нативной структуры, будучи результатом нековалентных взаимодействий. Значения ΔG_D, то есть энергии, необходимой для раскручивания молекул различных белков, представлены в табл. 5.9. Эти величины свидетельствуют, что несмотря на различные внутримолекулярные взаимодействия, белки ста-

Таблица 5.9
Значение ΔG_D для некоторых белков по разным источникам

Белок	Значение pH	Температура, °C	ΔG_D, ккал/моль
α-Лактальбумин	7	25	4.4
Бычий β-лактоглобулин, A + B	7,2	25	7,6
Бычий β-лактоглобулин A	3,15	25	10,2
Бычий β-лактоглобулин B	3,15	25	11,9
Лизоцим T4	3,0	37	4,6
Лизоцим белка утиных яиц	7,0	37	12,2
G-Актин	7,5	25	6,5
Липаза (из *Aspergillus*)	7,0		11,2
Тропонин	7,0	37	4,7
Овальбумин	7,0	25	6,0
Цитохром C	5,0	37	7,9
Рибонуклеаза	7,0	37	8,1
α-Химотрипсин	4,0	37	8,1
Трипсин	—	37	13,2
Пепсин	6,5	25	10,9
Гормон роста	8,0	25	14,2
Инсулин	3,0	20	6,5
Щелочная фосфатаза	7,5	30	20,3

Примечание. ΔG_D представляет разницу $G_U - G_N$, где G_U и G_N — это свободная энергия белковой молекулы соответственно в денатурированном и нативном состояниях.

бильны лишь в незначительной степени. Например, значение ΔG_D у большинства белков соответствует энергии, эквивалентной одной или трем водородным связям или от двух до пяти гидрофобным взаимодействиям (исходя из предположения, что разрушение нескольких нековалентных взаимодействий дестабилизирует нативную структуру многих белков).

Белки не являются «жесткими» молекулами — они гибкие и подвижные, а их нативное состояние является метастабильным — разрушение от одной до трех водородных связей или нескольких гидрофобных взаимодействий может легко привести к общему конформационному изменению белка. Изменчивость конформации в зависимости от условий раствора необходима для выполнения белками нескольких биологических функций. Например, достаточное связывание субстратов или протетических лигандов с ферментами неизменно включает реорганизацию полипептидных сегментов в местах связывания. С другой стороны, белки, которым для выполнения своей биологической фукции необходима высокая структурная стабильность, обычно стабилизованы внутримолекулярными дисульфидными связями, эффективно противостоящими конформационной энтропии (то есть стремлению полипептидной цепи к «раскручиванию»).

5.4. Денатурация белков

Нативная структура белков является результатом действия различных сил притяжения и отталкивания, обусловленных внутримолекулярными силами, а также взаимодействия различных групп белка с окружающим водным раствором. Нативная структура представляет собой преимущественно продукт окружения данного белка и является наиболее термодинамически стабильной с наименьшей свободной энергией.

Любые изменения в окружении, например, значения pH, ионной силы, температуры, состава раствора и т. д., способствуют тому, что молекула принимает новую равновесную структуру. Незначительные изменения в структуре, не меняющие радикально молекулярную архитектуру белка, обычно рассматривают как «изменчивость конформации», тогда как основные изменения во вторичной, третичной и четвертичной структурах без разрушения каркаса пептидных связей — как «денатурацию». Со структурной точки

зрения нативная структура белков поддается определению по кристаллографическим данным с указанием расположения каждого атома в молекуле, но это невозможно для денатурированного состояния. Денатурация с применением денатурирующих агентов относится к явлениям с хорошо определенным при нефизиологических условиях первоначальным состоянием, но при этом не учитываются химические изменения белков. В денатурированном состоянии из-за большей степени вращательного движения диэдральных углов полипептидной цепи белки могут принимать несколько конформационных состояний с небольшим различием в свободной энергии (рис. 5.11). Некоторые белки в денатурированном состоянии обладают остаточной скрученной структурой в большей степени, чем другие. Следует отметить, что даже в полностью денатурированном состоянии обычные глобулярные белки (за исключением желатина) не представляют собой правильные неупорядоченные кольца. Это объясняется характером частичных двойных амидных связей и локальными стерическими ограничениями объемной стороны цепи, не позволяющими полипептидному каркасу свободно вращаться на 360°.



Рис. 5.11. Схематическое представление энергии белковой молекулы как функции ее конформационного состояния. Конформация с наименьшей энергией обычно соответствует нативному состоянию

Характеристическая вязкость [η] полностью денатурированного белка является функцией числа аминокислотных остатков и выражается как

$$[\eta] = 0{,}71n^{0{,}66}, \tag{5.35}$$

где n — количество аминокислотных остатков в данном белке [121].

Зачастую денатурация воспринимается негативно из-за потери белками некоторых свойств. Многие биологически активные белки при денатурации теряют свою активность. В случае пищевых белков денатурация обычно приводит к утрате растворимости и некоторых функциональных свойств, однако что касается использования в пищевых продуктах, то денатурация белков в процессе приготовления не всегда нежелательна, а иногда, наоборот, необходима. Так, частичная денатурация белка на границе раздела фаз «воздух–вода» и «масло–вода» улучшает пенообразование и эмульгирующие свойства, тогда как избыточная термическая денатурация соевого белка их ухудшает. С другой стороны, термическая денатурация значительно облегчает усвояемость белков бобовых культур в результате инактивации их ингибитора — трипсина. Частично денатурированные белки усваиваются лучше, чем нативные. В белковых напитках, где необходима растворимость и дисперсность, даже частично денатурированные белки вызывают хлопьеобразование (флокуляцию) и выпадение осадка при хранении, а значит, нежелательно влияют на органолептические свойства готового продукта. Термическая денатурация является предпосылкой для гелеобразования белков под воздействием тепла. Таким образом, для выбора правильной технологии обработки необходимо знать свойства окружающей среды и другие факторы, влияющие на стабильность структуры белков в пищевых системах.

5.4.1. Термодинамика процесса денатурации

Денатурация представляет собой процесс преобразования определенной скрученной структуры белка, образованной при физиологических условиях, в раскрученное состояние при нефизиологических условиях. Поскольку структура — это параметр, с трудом поддающийся количественному определению, прямые измерения доли денатурированного и нативного белков в растворе невозможны. Вместе с тем конформационные преобразования изменяют некоторые химические и физические свойства белков, например, поглощение в УФ-спектре, флуоресценцию, вязкость, коэффициент осаждения, направление оптического

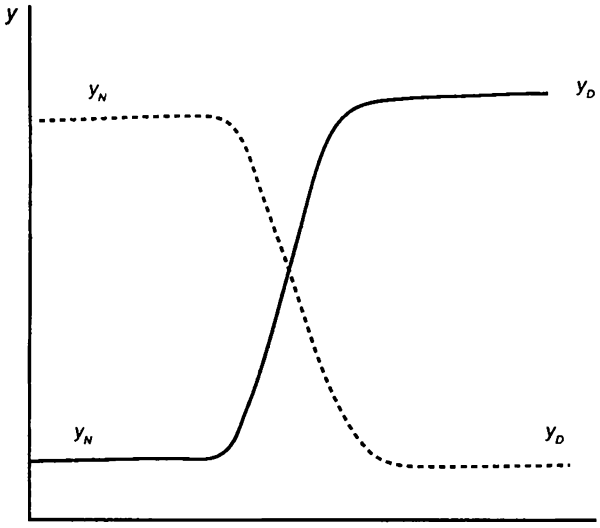


Рис. 5.12. Типичная кривая денатурации белка *y* соответствует любому физическому или химическому свойству молекулы белка, изменяющемуся при изменении конформации белка. Кривые y_N и y_D представляют значения *y* соответственно для нативного или денатурированного состояния

вращения, круговой (циркулярный) дихроизм*, реактивность сульфгидрильных групп и ферментную активность. Таким образом, денатурацию белков можно изучать по изменению физических и химических свойств белков.

Если изменение некоторого физического или химического свойства *y* исследовать как функцию концентрации денатурирующего вещества или температуры, то многие мономерные глобулярные белки подчиняются характерной кривой, приведенной на рис. 5.12. Кривые y_N и y_D — это графическое представление функции *y* для соответственно нативного и денатурированного состояний белка.

Для большинства белков по мере увеличения концентрации денатурирующего вещества или температуры значение *y* остается неизменным до некоторой критической точки, где в некоторой узкой области концентрации или температуры значение y_N резко изменяется до y_D. Для большинства глобулярных белков такой переход очень резок, что говорит о комплексном характере процесса денатурации. По мере разрушения нескольких взаимодействий или при увеличении концентрации денатурирующего вещества или повышения температуры молекула белка начинает «раскручиваться». Такой комплексный характер раскручивания предполагает, что глобулярные белки могут существовать только в нативном или денатурированном состоянии без каких-либо промежуточныйх стадий. Такая модель «двухступенчатого перехода» в равновесном состоянии между нативным и денатурированным состоянием в области перехода выражается как

$$N \overset{K_D}{\Leftrightarrow} D$$
$$K_D = [D]/[N] \tag{5.36}$$

где K_D — это константа равновесного состояния.

Поскольку концентрация молекул денатурированного белка в отсутствие денатурирующего вещества (или критического нагрева) крайне мала (примерно $1/10^9$), вычислить значение K_D невозможно. Вместе с тем в переходной области при достаточно большой концентрации денатурирующего вещества (или при достаточно высоких температурах) увеличение доли молекул денатурированных белков позволяет определить кажущуюся константу равновесного состояния ($K_{D,\text{каж.}}$). В области перехода, где присутствуют и нативные, и денатурированные молекулы белка, величина *y* вычисляется по формуле

$$y = f_N y_N + f_D y_D, \tag{5.37}$$

где f_N и f_D — доли белка в нативном и денатурированном состояниях; y_N и y_D — значения *y* в тех же состояниях. Из рис. 5.12 следует, что

$$f_N = \frac{(y_D - y)}{(y_D - y_N)}; \tag{5.38}$$

* Круговой дихроизм (циркулярный дихроизм) оптически активных молекул — это зависимость коэффициента поглощения света от направления круговой поляризации. Эффект открыт Эме Коттоном в 1911 г., и поэтому иногда его называют «эффектом Коттона». — *Примеч. ред.*

$$f_D = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y_N)}. \tag{5.39}$$

Кажущаяся константа равновесия рассчитывается как:

$$K_{D,\text{каж.}} = \frac{f_D}{f_N} = \frac{(y - y_N)}{(y_D - y_N)}, \tag{5.40}$$

а свободная энергия денатурации задается формулой:

$$\Delta G_{\text{каж}} = RT\ln K_{D,\text{каж}} \tag{5.41}$$

Кривая зависимости $-RT\ln K_{D,\text{каж}}$ от концентрации денатурирующего вещества обычно представляет собой прямую линию, и поэтому по отрезку ординаты y можно получить значение K_D и ΔG_D для белка в чистой воде (или в буферном растворе в отсутствие денатурирующего вещества). Энтальпию денатурации ΔH_D рассчитывают по изменению свободной энергии в ходе изменения температуры с использованием уравнения Вант-Гоффа:

$$\Delta H_D = -R\frac{d(\ln K_D)}{d(1/T)}. \tag{5.42}$$

Мономерные белки, содержащие два или более домена с различной структурной стабильностью, обычно характеризуются на кривой денатурации несколькими переходными областями. Если эти переходные области заметно отделены друг от друга, то стабильность каждого домена можно получить с использованием вышеописанной модели двухступенчатого перехода. Денатурация олигомерных белков продолжается путем диссоциации субъединиц, после чего следует их денатурация.

Денатурация белка может быть обратимой, особенно для небольших мономерных белков. При удалении из раствора белка денатурирующего вещества (или при охлаждении образца) большинство мономерных белков (при отсутствии агрегации) возвращаются при подходящих условиях (значение pH, ионная сила, окислительно-восстановительный потенциал и концентрация белка) к своей нативной конформации. Многие белки заново «складываются» при концентрации белка менее 1 мкМ. При более высоких концентрациях сворачивание частично ингибируется за счет увеличения межмолекулярных взаимодействий по сравнению с внутримолекулярными. Образование правильных пар дисульфидных мостиков при повторном сворачивании облегчается окислительно-восстановительным потенциалом, сопоставимым саналогичным для биологических жидкостей.

5.4.2. Денатурирующие факторы

5.4.2.1. Физические факторы

5.4.2.1.1. Температура

Наиболее распространенным способом денатурации белков при переработке пищевых продуктов и их консервировании является тепловая обработка, в ходе которой белки денатурируются в разной степени. Это влияет на их функциональные свойства в пищевых продуктах, а значит, необходимо знать факторы, влияющие на денатурацию.

При постепенном нагревании раствора белка выше некоторой критической температуры происходит четкий переход белка из натурального состояния в денатурированное. Температуру в середине зоны перехода, где отношение концентраций белка в нативном и денатурированном состоянии равно 1, называются или температурой плавления T_m, или температурой денатурации T_D. При денатурации белков стабильность нековалентных взаимодействий обусловлена прежде всего температурой, и при ее повышении происходит дестабилизация водородных связей и электростатических взаимодействий, экзотермичных по своей природе, а также стабилизация эндотермичных гидрофобных взаимодействий. Гидрофобные взаимодействия наиболее сильны при температуре 70–80 °C [22]. Помимо нековалентных взаимодействий большую роль в стабильности белка играет температурная зависимость энтропии конформации ($T\Delta S_{conf}$), которая при

повышении температуры возрастает, а это благоприятствует «раскручиванию» спиралей молекулы белка. Общая стабильность белка определяется суммарным эффектом этих взаимодействий. Вместе с тем тщательный анализ влияния температуры на различные белковые взаимодействия показал, что в глобулярных белках большинство заряженных групп находится на поверхности молекулы белка и контактируют с водной средой, обладающей большой диэлектрической проницаемостью. Из-за экранирующего действия этой среды силы отталкивания и притяжения между несущими электрический заряд группами сильно ослабевают. Кроме того, при физиологической ионной силе экранирование заряженных белковых групп противоионами приводит к дальнейшему ослаблению электростатических взаимодействий, так что общий эффект электростатических взаимодействий в белках невелик. Поскольку водородные связи в белках в водной среде в целом нестабильны, их стабильность определяется гидрофобными взаимодействиями, формирующими локальную среду с низкой диэлектрической проницаемостью. Это означает, что при наличии неполярного окружения водородные связи при росте температуры не затрагиваются. Из этого следует, что хотя температура и влияет на полярные взаимодействия, они не играют большой роли в термической денатурации белков, и стабильность нативного состояния белков зависит от разницы в свободной энергии между гидрофобными взаимодействиями, способствующими «скрученному» состоянию, и энтропией конформационных переходов, обусловливающей «раскручивание» молекулы белка. То есть

$$\Delta G_{N\to D} = \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{conf} \tag{5.43}$$

Зависимость стабильности белков от температуры при постоянном давлении можно рассчитать по формуле [33]:

$$\frac{\partial \Delta G_{N\to D}}{\partial T} = \frac{\partial \Delta G_{H\phi}}{\partial T} + \frac{\partial \Delta G_{conf}}{\partial T}. \tag{5.44}$$

При повышении температуры гидрофобные взаимодействия усиливаются, и, следовательно, $\partial \Delta G_{H\phi}/\partial T > 0$. Конформационная энтропия при «раскручивании» молекулы белка возрастает, и следовательно, $\partial \Delta G_{Hconf}/\partial T < 0$. По мере роста температуры разница между двумя этими противоположно направленными силами достигает некоторого значения, где $\partial \Delta G_{N\to D}/\partial T \approx 0$. Значение температуры при таком сооотношении и называют температурой денатурации белка.

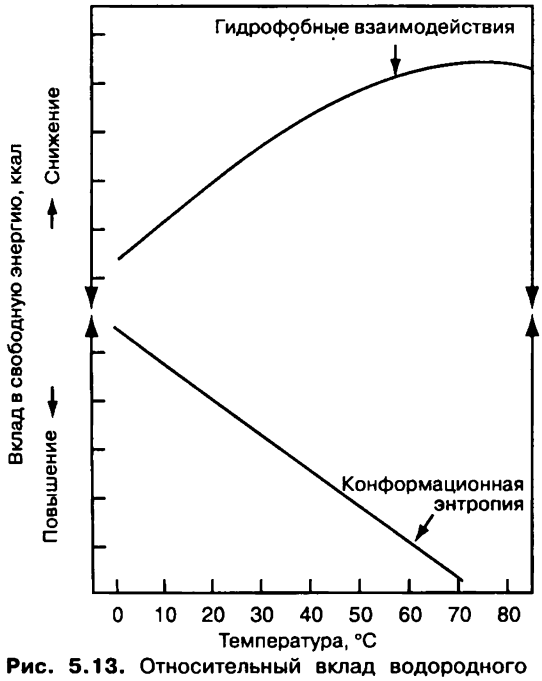


Рис. 5.13. Относительный вклад водородного связывания, гидрофобных взаимодействий и конформационной энтропии в изменение свободной энергии, определяющей стабильность белка, как функция температуры

Относительный вклад основных взаимодействий в стабильность белковой молекулы в виде функции температуры представлен на рис. 5.13. Здесь следует отметить, что на стабильность водородного связывания температура влияет не слишком сильно. Значения T_D для некоторых белков приведены в табл. 5.10 [14].

Зачастую предполагается, что чем ниже температура, тем стабильность белков выше, но это не всегда так, поскольку некоторые белки денатурируются при низких температурах [16]. Из рис. 5.14, например, следует, что стабильность лизоцима с понижением температуры повышается, а миоглобин и лизоцим фага T4 проявляют максимальную стабильность при температурах соответственно 30 и 12,5 °С [18, 73]. При более низких или высоких температурах миоглобин и лизоцим менее стабильны. При хранении в условиях отрицательных температур эти два белка денатурируют. Температура максимальной стабильности (с минимальной свободной энергией) зависит от воздействия температуры на стабилизирующие и дестабилизирующие силы в белках.

Белки, изначально стабилизированные гидрофобными взаимодействиями, при комнатной температуре более

Таблица 5.10
Температуры термической денатурации (T_D) и средняя гидрофобность белков. По [14]

Белок	Значение T_D	Средняя гидрофобность, ккал/(моль · кол-во остатков)
Трипсиноген	55	0,89
Химотрипсиноген	57	0,90
Эластаза	57	—
Пепсиноген	60	0,97
Рибонуклеаза	62	0,78
Карбоксипептидаза	63	—
Алкогольдегидрогеназа	64	—
Бычий сывороточный альбумин	65	1,02
Гемоглобин	67	0,96
Лизоцим	72	0,90
Инсулин	76	1,00
Яичный альбумин	76	0,97
Ингибитор трипсина	77	
Миоглобин	79	1,05
α-Лактальбумин	83	1,03
Цитохром С	83	1,.06
β-Лактоглобулин	83	1,09
Авидин	85	0,92
Соевый глицинин	92	
Белок 11S кормовых бобов	94	
Белок 11S подсолнечника	95	—
Глобулин овса	108	—

стабильны, чем при холодильном хранении. Внутримолекулярные дисульфидные связи в белках способствуют стабилизации белков как при низких, так и при высоких температурах, поскольку они протидействуют энтропии конформационных изменений цепи.

Некоторые пищевые белки при низких температурах подвергаются обратимой диссоциации и денатурации. Глицинин (один из резервных соевых белков) при температуре 2 °С агрегируется и осаждается [68], но при возврате к комнатной температуре он становится растворимым. При хранении обезжиренного молока при температуре 4 °С из мицелл казеина диссоциирует β-казеин, что изменяет физико-химические свойства и свойства казеиновых мицелл относительно сычужной свертываемости молока. Некоторые олигомерные ферменты, в частности лактатдегидрогеназа и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, при хранении при 4 °С теряют свою ферментную активность из-за диссоциации субъединиц,

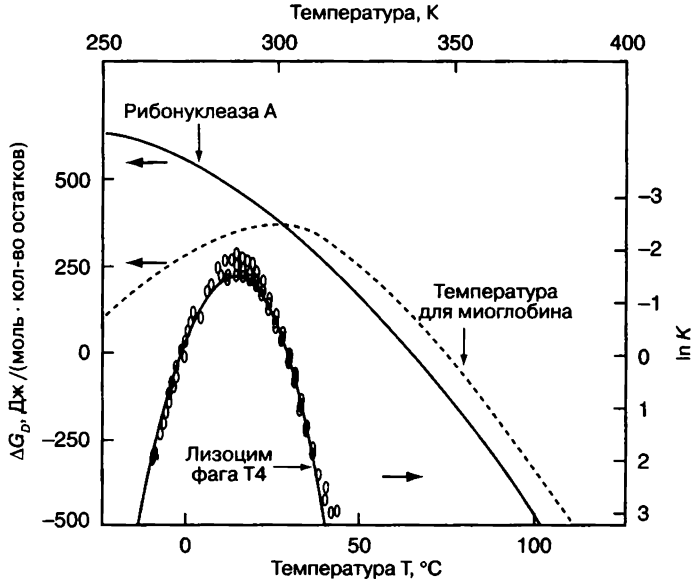


Рис. 5.14. Зависимость стабильности белков (ΔG_D) от температуры: кривая для миоглобина обозначена пунктиром, для рибонуклеазы А — сплошной линией, а для мутирующего фага Т4 лизоцима — (–0–0–); K — это константа состояния равновесия. По [18, 73]

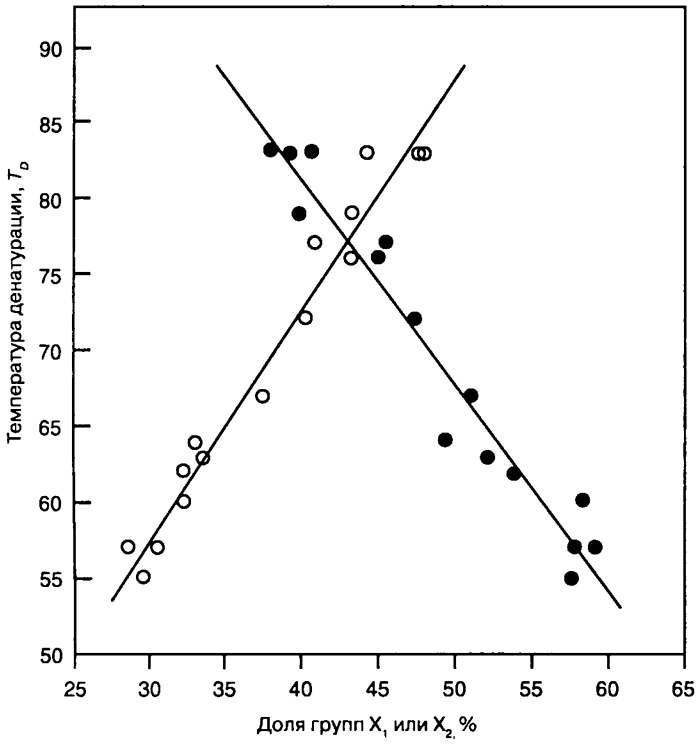


Рис. 5.15. Групповая корреляция аминокислотных остатков с термостабильностью глобулярных белков. В группу X_1 (•) входят *Asp*, *Cys*, *Glu*, *Lys*, *Leu*, *Arg*, *Trp* и *Tyr*, в группу X_2 (○) — *Ala*, *Asp*, *Gly*, *Gln*, *Ser*, *Thr*, *Val* и *Tyr*. По [101]

однако при выдержке в течение нескольких часов при комнатной температуре они восстанавливают свою структуру и активность [127].

На стабильность белков влияет и их аминокислотный состав. Белки с высокой долей гидрофобных аминокислотных остатков, особенно *Val, Ile, Leu*, и *Phe*, более стабильны, чем более гидрофильные белки [137]. Положительная корреляция существует также между термостабильностью и процентным соотношением некоторых аминокислотных остатков. Например, из статистического анализа 15 различных белков следует, что температура термической денатурации положительно коррелирует (r = 0,98) с суммарным содержанием остатков *Asp, Cys, Glu, Lys, Leu, Arg, Trp* и *Tyr*, и отрицательно коррелирует (r = –0,975) с суммарным содержанием *Ala, Asp, Gly, Gln, Ser, Thr, Val* и *Tyr* (рис. 5.15) [101]. Другие аминокислотные остатки слабо влияют на T_D.

Термостойкость белков термофильных и гипертермофильных микроорганизмов, способных противостоять действию повышенных температур, также относят на счет их уникального аминокислотного состава [111]. В этих белках содержатся малые количества *Asn* и *Gln* (в отличие от мезофильных микроорганизмов), а *Asn* and *Gln* чувствительны к дезамидированию при высоких температурах, так что повышенное содержание этих остатков может частично влиять на снижение нестабильности белка. Содержание *Cys, Met* и *Trp*, которые при высоких температурах легко окисляются, в гипертермостойких белках также невелико. С другой стороны, термостойкие белки содержат много остатков *Ile* и *Pro* [117, 126]. Считается, что повышенное содержание *Ile* способствует лучшей упаковке внутренней цепи белка [110], что уменьшает количество внутренних полостей и свободного пространства. Отсутствие свободного пространства снижает подвижность полипептидной цепи при высоких температурах и минимизирует повышение конфигурационной энтропии. Повышенное же содержание остатков *Pro*, особенно в петлеобразных областях белковой цепи, придает структуре жесткость [75, 87]. Изучение кристаллографической структуры некоторых белков и ферментов термофильных микроорганизмов показало, что в них по сравнению с мезофильными составляющими также присутствует значительное число ионных пар, локализованных в изломах белковой структуры, и существенное количество скрытых молекул воды, связывающих сегменты мостиками из водородных связей [4, 132]. Полярное взаимодействие (солевые мостики и водородная связь между сегментами) в неполярной внутренней части белка обусловливает термостойкость белков термофильных и гипертермофильных микроорганизмов, причем этому способствует высокая доля *Ile*-остатков. Как мы уже отмечали, каждый солевой мостик во внутренней части белка, где диэлектрическая постоянная равна примерно 4, способен повысить стабильность белковой структуры на 20 ккал/моль.

Термическая денатурация мономерных глобулярных белков в большинстве случаев обратима. Например, если нагреть мономерные ферменты до 100 °С и затем быстро их охладить до комнатной температуры, то они полностью восстанавливают свою активность. Вместе с тем при длительном нагреве до 90–100 °С даже при нейтральных значениях pH термическая денатурация может стать необратимой [5], что объясняется некоторыми химическими изменениями в белках — дезамидированием остатков *Asn* и *Gln*, разрушением пептидных связей *Asp*-остатка, разрушением *Cys*- и цистинового остатков, а также агрегацией [5, 124].

Присутствие воды значительно облегчает термическую денатурацию белков [46]. Обезвоженный белок очень стоек к термической денатурации. Значение T_D резко уменьшается, если содержание влаги увеличивается с 0 до 35 г/г белка (рис. 5.16). При увеличении содержания влаги от 0,35 до 0,75 г/г белка происходит лишь незначительное снижение T_D. При более высоком содержании влаги на 1 г белка значение T_D белка то же, что и для разбавленного раствора белка. Влияние гидратации на термостойкость белка фундаментально обусловлено динамикой белков. В сухом состоянии белки обладают статичной структурой, то есть полипептидные сегменты имеют ограниченную подвижность. По мере увеличения содержания влаги гидратация и частичное проникновение воды в поверхностные пустоты вызывает набухание белка. Такое набухшее состояние, когда белки вместе с водой переходят из аморфного состояния в резиноподобное, при комнатной температуре становится максимальным при содержании влаги 0,3–0,4 г/г белка. Это набухание увеличивает подвижность и гибкость белковой цепи, так что молекула становится структурой более динамичной. При нагревании такая динамичная гибкая структура поставляет больше воды для образования солевых мостиков и пептидных водородных связей, чем у обезвоженного белка, что приводит к снижению T_D.

На термостойкость белков в водных растворах влияет добавление соли и сахара — такие сахара, как сахароза, лактоза, глюкоза и глицерин, делают белки более стойкими к термической денатурации [69]. Добавление к соевым белкам, сывороточному белку и β-лактоглобулину 0,5 М NaCl значительно повышает их T_D [25, 27, 54].

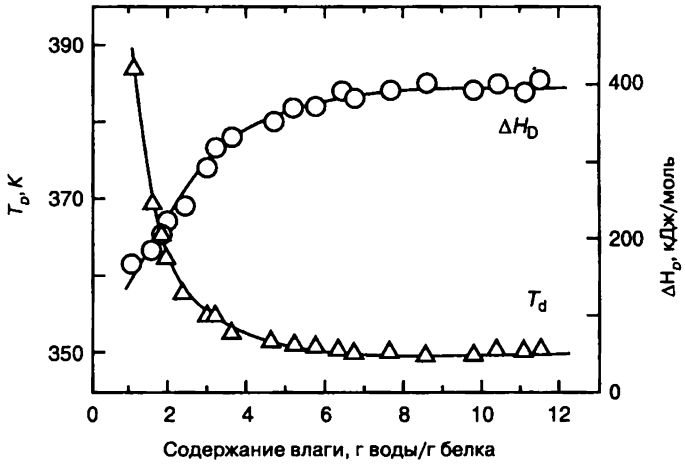


Рис. 5.16. Влияние содержания влаги на температуру денатурации (T_D) и энтальпию денатурации (ΔH_D) овальбумина. По [46]

5.4.2.1.2. Гидростатическое давление и денатурация

Одним из факторов, изменяющих конформацию белков, является гидростатическое давление. В отличие от термической денатурации, которая обычно наблюдается в условиях атмосферного давления при температурах 40–80 °С, денатурация под давлением происходит при температуре 25 °С (если давление достаточно). Большинство белков денатурируют при давлении 1–12 кбар, что подтверждается изменениями их спектральных свойств. Средняя точка структурного перехода под действием давления находится в области 4–8 кбар [57].

Денатурация под давлением происходит прежде всего из-за того, что молекулы белка гибкие и сжатые. Хотя аминокислотные остатки во внутренней области глобулярных белков плотно упакованы, в ней существуют некоторые полости, обусловливающие сжимаемость. Средний парциальный удельный объем глобулярных белков в гидратированном состоянии составляет около 0,74 мл/г. Удельный парциальный объем можно рассматривать как сумму трех слагаемых:

$$\upsilon^0 = V_C + V_{Cav} + \Delta V_{Sol}, \qquad (5.45)$$

где V_C — сумма объемов атомов; V_{Cav} — сумма объемов пустот внутри молекулы белка; ΔV_{Sol} — изменение объема при гидратации [47].

Чем больше V_{Cav}, тем больше вклад пустот в удельный парциальный объем и тем не менее белок стоек к действию давления. В нитевидных белках пустоты практически отсутствуют, из-за чего они более стойки к действию гидростатического давления, чем глобулярные белки.

Денатурация глобулярных белков под давлением обычно сопровождается уменьшением объема на 30–100 мл/моль. Это уменьшение обусловлено действием двух факторов: уменьшением доли пустот по мере «раскручивания» молекул белков и гидратацией неполярных аминокислотных остатков, «вывернутых наружу» в процессе этого раскручивания. Последнее приводит к уменьшению объема (см. раздел 5.3.2). Изменение объема связано с изменением свободной энергии следующим образом:

$$\Delta V = \frac{d(\Delta G)}{dp}, \tag{5.46}$$

где p — гидростатическое давление.

Если бы глобулярные белки под давлением полностью раскручивались, то объем увеличился бы на 2%, однако изменение объема денатурированных под давлением белков составляет 30–100 мл/моль, что соответствует 0,5% объема, то есть молекулы белка даже при гидростатическом давлении более 10 кбар раскручиваются лишь частично.

Денатурация под давлением является сильно обратимым процессом. При возврате к атмосферному давлению большинство ферментов в разбавленном растворе восстанавливает свою активность [66], однако восстановление полной активности при этом занимает несколько часов. В случае денатурации олигомерных белков и ферментов субъединицы сначала диссоциируют при 0,001–2 кбар, а затем при более высоком давлении денатурируют [128]; при снятии давления субъединицы реассоциируются и через несколько часов почти полностью восстанавливают ферментативную активность.

В настоящее время обработка пищевых продуктов под высоким гидростатическим давлением изучается на предмет применимости в промышленном производстве, в частности, для инактивации микроорганизмов и гелеобразования. Поскольку при высоком гидростатическом давлении (2–10 кбар) клеточные мембраны необратимо разрушаются с повреждением органелл микроорганизмов, с его помощью можно инактивировать вегетативные микроорганизмы [72]. При давлении в 1–7 кбар гелеобразование яичного белка, 16%-ного раствора соевого белка или 3%-ного раствора октамиозина может быть достигнуто при температуре 25 °С за 30 мин. Такие полученные под действием давления гели мягче, чем полученные термической денатурацией белков [94]. Если говядину обработать под давлением 1–3 кбар, то происходит частичная фрагментация миофибрилл, что может оказаться полезным для тендеризации мяса [119] и гелеобразования миофибриллярных белков [7]. Давление, в отличие от температуры, не повреждает аминокислоты, натуральные красители и вкусоароматические вещества, а также не приводит к образованию токсичных соединений. Тем самым обработка некоторых пищевых продуктов под высоким давлением обладает рядом преимуществ, хотя и обходится дороже.

5.4.2.1.3. Денатурация под действием сдвига

Денатурация белков бывает обусловлена также механическим сдвигом при взбалтывании, перемешивании, взбивании и т. д. При активном перемешивании многие белки денатурируют и выпадают в осадок [93]. Это объясняется тем, что денатурация происходит под влиянием инкорпорирования в границу раздела фаз «воздух–жидкость» пузырьков воздуха и адсорбции белковых молекул. Поскольку энергия границы раздела фаз «воздух–жидкость» больше, чем энергия объемной фазы, в белках на этой границе происходят конформационные изменения, степень которых зависит от гибкости молекулы белка. Более гибкие белки на границе раздела фаз «воздух–жидкость» денатурируют быстрее, чем более жесткие молекулы. Неполярные остатки денатурированных белков ориентируются по направлению к газообразной фазе, а полярные остатки — по направлению к жидкой фазе.

В некоторых технологиях переработки пищевых продуктов используются высокое давление, сдвиг и тепловая обработка. Например, это происходит при экструзии, высокоскоростном перемешивании и гомогенизации. При высокой скорости сдвига, обеспечиваемой лопастями месильного органа, образуются ультразвуковые импульсы, а на заднем крае лопасти образуется кавитационный эффект, причем и то и другое способствует денатурации белка. Сочетание высокой температуры и высоких усилий сдвига приводит к необратимой денатурации белка. Так, если 10–20%-ный раствор сывороточного белка со значением pH 3,5–4,4 и температурой 80–120 °С перемешивать при 7500–10 000 об./с, то образуются нерастворимые сферические макроколлоидные частицы диаметром 1 мкм. При таких условиях получают гидратированный препарат *Simplesse,* обладающей мягкими, близкими к эмульсии, органолептическими свойствами [118].

5.4.2.2. Химические факторы

5.4.2.2.1. Значение pH

Белки наиболее стойки к денатурации в изоэлектрической точке, чем при любых других значениях pH. При нейтральном pH большинство белков имеют отрицательный заряд — лишь немногие белки заря-

жены положительно. Поскольку общая энергия электростатического отталкивания мала по сравнению с другими взаимодействиями, большинство белков при pH, близком к нейтральному, стабильны. Вместе с тем, силы внутримолекулярного электростатического отталкивания, возникающие из-за сильного общего заряда при крайних значениях pH, приводят к набуханию и раскручиванию белковых молекул. Степень раскрученности больше при крайних щелочных значениях pH, чем при крайних кислотных, что объясняется ионизацией частично «заглубленных» карбоксильных, фенольных и сульфгидрильных групп. Это вызывает раскручивание полипептидной цепи по мере проникновения этих групп в водную среду. Денатурация под действием pH в большинстве случаев обратима, однако в некоторых случаях частичный гидролиз пептидных связей, дезамилирование остатков *Asn* и *Gln*, разрыв сульфгидрильных групп при щелочных значениях pH, а также агрегация могут привести к необратимой денатурации белков.

5.4.2.2.2. Органические растворители

Органические растворители влияют на стабильность белковых гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также водородного связывания несколькими способами [52]. Поскольку неполярные цепочки в органических растворителях более растворимы, чем в воде, они ослабляют гидрофобные взаимодействия. С другой стороны, поскольку стабильность и образование пептидных водородных связей при меньшей диэлектрической проницаемости усиливается, некоторые органические растворители действительно усиливают или способствуют образованию пептидных водородных связей. Например, в глобулярных белках 2-хлорэтанол приводит к увеличению доли α-спиралевидных структур. Органические растворители оказывают на электростатические взаимодействия двоякое действие. Уменьшая диэлектрическую постоянную среды, они усиливают электростатические взаимодействия между противоположно заряженными группами и отталкивание одноименно заряженных групп. Общее действие органических растворителей на структуру белка зависит, следовательно, от их влияния на различные полярные и неполярные взаимодействия. В низких концентрациях некоторые органические растворители могут повышать стойкость некоторых ферментов к денатурации [9], однако в высоких концентрациях все органические растворители вызывают денатурацию белков из-за солюбилизации неполярных боковых цепочек.

5.4.2.2.3. Денатурация и низкомолекулярные добавки

На стабильность белков в водных растворах влияют такие низкомолекулярные растворенные вещества, как мочевина, гуанидина гидрохлорид (GuHCl), поверхносто-активные вещества (ПАВы), сахара и нейтральные соли. Если мочевина, GuHCl и ПАВы дестабилизируют нативную конформацию белков [34], то сахара, наоборот, ее стабилизируют. Что касается нейтральных солей, то одни соли (сульфаты, фосфаты и фториды натрия, называемые космотропами) стабилизируют структуру белка, а другие (бромиды, йодиды, перхлораты и тиоционаты, называемые хаотропами) ее дестабилизируют.

Считается, что стабилизирующее или дестабилизирующее действие низкомолекулярных добавок подчиняется некоторому универсальному механизму, зависящему от предпочтительных взаимодействий— либо с водной фазой, либо с поверхностью молекулы белка. Добавки, стабилизирующие структуру белка, очень слабо связываются с его поверхностью, но усиливают ее гидратацию (рис. 5.17). Такие добавки обычно не проникают в окружающую белок область, то есть их концентрация вблизи белка ниже, чем в объемной фазе раствора. Из-за этого градиента концентрации, возможно, создается градиент осмотического давления, достаточный для повышения температуры термической денатурации белка. Исследования стабильности белков при контакте с глицерином показали, что лизоцим

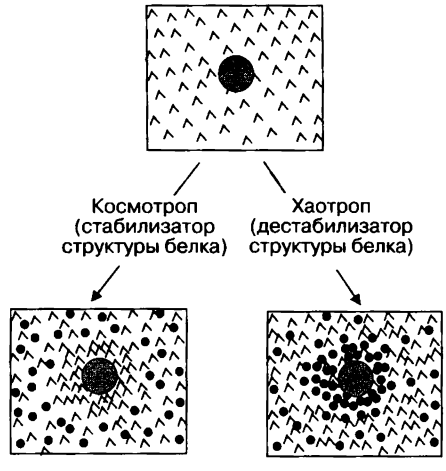


Рис. 5.17. Схематическое представление предпочтительных связывания и гидратации белка в присутствии низколмекулярных добавок. По [22]

в растворе глицерина имеет немного более «сжатое» состояние по сравнению с его состоянием в водном растворе [51], что может быть объяснено образованием вблизи поверхности белка своего рода «зоны вытеснения» для глицерина и появлением градиента осмотического давления.

У добавок, дестабилизирующих структуру белка, наблюдается противоположный эффект — эти добавки снижают стабильность белков, так как они преимущественно связываются с поверхностью молекулы белка и вызывают его дегидратацию. В этом случае молекулы воды вытесняются из области вокруг молекулы белка, и концентрация добавки в этой безводной области становится выше, чем в объемной фазе. Взаимодействия таких добавок с поверхностью белка, в основном неполярной, способствует раскручиванию молекулы белка, и заглубленные неполярные области становятся более доступными для дальнейшего взаимодействия с добавкой.

Если белок подвергается действию смеси стабилизирующих и дестабилизирующих растворенных веществ, то их суммарный эффект на стабильность белка подчиняется правилу аддитивности. Например, сахароза и полиолы считаются стабилизирующими структуру белка, тогда как GuHCl — дестабилизирующим веществом. Если смешать сахарозу с GuHCl, то необходимая для раскручивания структуры белков концентрация GuHCl возрастает с увеличением концентрации сахарозы [122]. Следовательно, добавление таких веществ, как сахароза, содержащих несколько замещаемых атомов водорода, противодействует изменению структуры воды под действием GuHCl и мочевины. Таким образом, в присутствии полиолов денатурация белков требует более высоких концентраций GuHCl и мочевины [122]. Из этого также следует, что в присутствии добавок изменение в структуре воды некоторым фундаментальным образом связано с действием добавок на стабильность белковой структуры. Точный механизм этой связи пока неясен (частично из-за неполноты наших знаний о структуре воды).

5.4.2.2.4. Органические растворенные вещества

Денатурацию белков вызывают также органические растворенные вещества, прежде всего, мочевина и GuHCl. Для многих глобулярных белков середина перехода из нативного в денатурированное состояние при комнатной температуре соответствует концентрации мочевины 4–6 М, а GuHCl — 3–4 М. Полный переход происходит при концентрации мочевины 8 М, а GuHCl — около 6 М, причем GuHCl является более сильным денатурирующим веществом из-за его ионного характера. Многие глобулярные белки не полностью денатурируются даже при концентрации мочевины 8 М, а при концентрации GuHCl 8М они обычно находятся в случайном свернутом состоянии (полностью денатурированы).

Денатурация под действием этих двух веществ обусловлена действием двух механизмов. Первый из них заключается в предпочтительном связывании мочевины и GuHCl с денатурированным белком. Перемещение денатурированного белка в виде комплекса «белок–денатурирующее вещество» смещает равновесие $N \leftrightarrow D$ вправо. По мере увеличения концентрации денатурирующего вещества происходит дальнейшее связывание его с белком в комплекс, что приводит к полной денатурации белка в растворах мочевины и GuHCl. Поскольку связь денатурирующего вещества с белком очень слаба, для полной денатурации требуется большая его концентрация. Второй механизм заключается в солюбилизации гидрофобных аминокислотных остатков. Поскольку эти вещества обладают способностью к водородному связыванию, при высоких концентрациях они разрушают структуру воды, что, в свою очередь, улучшает ее способность к растворению неполярных остатков. Это приводит к раскручиванию и солюбилизации неполярных остатков из внутренней части молекулы белка.

Денатурация в присутствии мочевины и GuHCl обратима, однако полная обратимость денатурации в присутствии мочевины достижима не всегда, так как часть мочевины превращается в цианаты и аммиак, а цианаты реагируют с аминогруппами и меняют заряд белка.

5.4.2.2.5. ПАВы

ПАВы, в частности додецилсульфат натрия (*SDS*) — это сильные денатурирующие вещества. При концентрации *SDS* 3–8 мМ денатурируются большинство глобулярных белков. Механизм денатурации заключается в предпочтительном связывании молекулы ПАВ с молекулой белка. Это вызывает сдвиг равновесного между нативным и денатурированным состоянием. В отличие от мочевины и GuHCl ПАВы связываются только с денатурированными белками, что и приводит к полной денатурации при сравнительно низкой

концентрации ПАВ (3–8 мМ). Такое сильное связывание объясняет необратимость данного вида денатурации. Глобулярные белки, денатурированные *SDS*, находятся не в случайном свернутом состоянии, а существуют в растворе *SDS* в виде палочкоподобной α-спиралевидной структуры. Такая палочкоподобная структура по праву считается денатурированной.

5.4.2.2.6. Хаотропные соли

Соли влияют на стабильность белков двумя различными способами. При малой концентрации ионы солей взаимодействуют с белками с помощью неспецифичных электростатических взаимодействий. Такая нейтрализация заряда белка обычно стабилизирует их структуру. Полная нейтрализация заряда ионами происходит при ионной силе порядка 0,2 М и не зависит от природы соли, однако при более высоких концентрациях (> 1 М) соли проявляют специфический ионный эффект, влияющий на структурную стабильность белков. Такие соли, как Na_2SCO_4 и NaF ее усиливают, а тиоцианат натрия (NaSCN) и натрия перхлорат ($NaClO_4$) ее ослабляют. На структуру белков больше влияют анионы, чем катионы. Влияние различных солей натрия на термическую денатурацию β-лактоглобулина показано на рис. 5.18. При равной ионной силе Na_2SCO_4 и NaCl повышают температуру денатурации T_D, тогда как NaSCN и $NaClO_4$ ее понижают. Несмотря на химическое сродство и конформационные различия, структурная стабильность макромолекул, включая ДНК, под действием высоких концентраций солей нарушается [21]. NaSCN и $NaClO_4$ — это сильные денатурирующие вещества. Относительную способность различных анионов при одинаковой ионной силе влиять на структурную стабильность белка (или ДНК) можно представить следующей последовательностью:

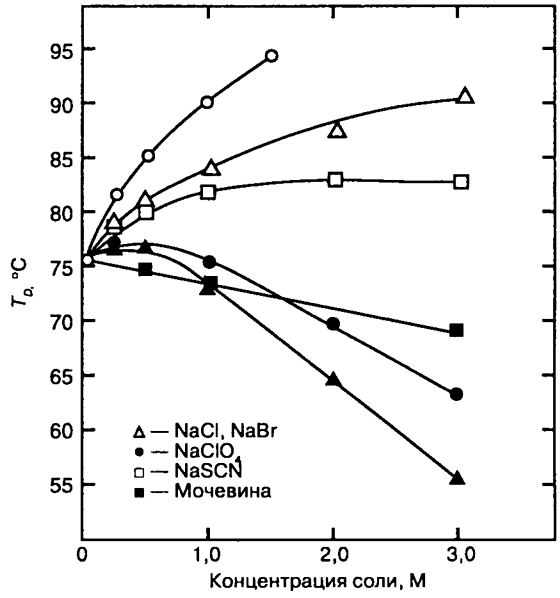


Рис. 5.18. Влияние различных солей натрия на температуру денатурации T_D β-лактоглобулина при pH 7,0. По [25]

$$F^- < SO^=_4 < Cl^- < Br^- < I^- < ClO^-_4 < SCN^- < Cl_3CCOO^-$$

Эта последовательность известна как ряд Гофмейстера или хаотропный ряд. Фториды, хлориды и сульфаты стабилизируют структуру, а соли с другими анионам ее дестабилизируют.

Механизм влияния солей на стабильность структуры белков зависит от способности солей связываться с белками или изменять их гидратационные свойства. Соли, стабилизирующие белки, усиливают их гидратацию и слабо связаны, тогда как соли, дестабилизирующие белки, уменьшают гидратацию белка и сильно с ним связаны [8]. Данный эффект обусловлен энергетическими обменами на границе «белок–вода». На более фундаментальном уровне стабилизация или денатурация белка под действием соли обусловлена ее воздействием на структуру воды. Соли, стабилизирующие белковую структуру, усиливают также водородные связи воды, а соли, приводящие к денатурации, разрушают структуру объемной воды так, что улучшают ее способность к растворению неполярных молекул. Другими словами, денатурация хаотропными солями может быть отнесена на счет дестабилизации гидрофобных белковых взаимодействий.

5.5. Функциональные свойства белков

Пищевые предпочтения человека обусловлены преимущественно такими органолептическими свойствами продуктов, как текстура, вкус и аромат, цвет и внешний вид. Они складываются из целого комплекса взаимодействий между основными и второстепенными компонентами продуктов. Белки существенно влияют на органолептические свойства пищевых продуктов. Например, органолептические свойства хлебобулочных и мучных кондитерских изделий во многом обусловлены вязкопластичностью и тестообразующими свойствами глютена пшеницы, текстура и сочность мясных продуктов — белками мышечной

ткани (актином, миозином, актомиозином и некоторыми растворимыми белками мяса), текстура и свертываемость молочных продуктов — уникальной коллоидной структурой мицелл казеина, а структура некоторых кексов, пирожных и взбитых десертов — свойствами яичного белка. Функциональные свойства некоторых белков в различных видах пищевых продуктов приведены в табл. 5.11 [64].

Функциональные свойства пищевых белков — это те их физические и химические свойства, которые определяют поведение белков в процессе переработки, хранения, кулинарной обработки и потребления пищевых продуктов.

Органолептические свойства обусловлены комплексными взаимодействиями различных функциональных ингредиентов. Например, органолептическое ощущение от кексов и пирожных обусловлено геле- и пенообразующей способностями, а также эмульгирующими свойствами входящих в их состав ингредиентов. Для использования белка в качестве ингредиента кексов, пирожных и других аналогичных изделий он должен обладать многими функциональными свойствами. Белки животного происхождения (например, молочные (казеины), яичный и мышечные) широко применяются в промышленном производстве пищевых продуктов. Эти белки представляют собой смесь нескольких белков с широким набором физико-химических свойств, которая обладает различными функциональными свойствами. Например, яичный белок обладает гелеобразующей, эмульгирующей и пенообразующей способностями, может связывать воду и коагулировать при нагревании, что делает его желательным компонентом во многих продуктах. Свойства яичного белка обусловлены комплексным взаимодействием составляющих его белков, а именно овальбумина, кональбумина, лизоцима, овомуцина и других альбуминоподобных белков. Растительные (например, соевый и белки других бобовых и масличных культур) и другие белки (в частности, сывороточные), в производстве традиционных пищевых продуктов используются меньше. Несмотря на

Таблица 5.11

Функциональные свойства белков в пищевых продуктах. По [64]

Функциональные свойства	Механизм действия	Тип пищевого продукта	Тип белка
Растворимость	Гидрофильность	Напитки	Сывороточные белки
Вязкость	Связывание воды, гидродинамические размер и форма молекул	Супы, подливы, салатные заливки (дрессинги), десерты	Желатин
Связывание влаги	Водородное связывание, гидратация ионов	Колбасные изделия, кексы, пирожные и хлебобулочные изделия	Мышечные белки, яичный белок
Гелеобразование	Захват и иммобилизация воды, образование сетевой структуры	Мясо, желе, мучные кондитерские и хлебобулочные изделия, сыр	Мышечные белки, яичный и молочный белки
Когезионно-адгезионные свойства	Гидрофобность, водородное и ионное связывание	Мясо, колбасные изделия, макаронные и хлебобулочные изделия	Мышечные белки, яичные белки, сывороточные белки
Эластичность	Гидрофобное связывание, дисульфидные мостики	Мясные и хлебобулочные изделия	Мышечные белки, белки злаковых культур
Эмульгирующие свойства	Адсорбция и пленкообразование на границе раздела фаз	Колбасные изделия, супы, дрессинги, кексы и пирожные	Мышечные белки, яичный и молочный белки
Пенообразующие свойства	То же	Взбитый крем (топпинг), мороженое, десерты, торты и пирожные	Яичный и молочный белки
Связывание жира и вкусоароматических соединений	Гидрофобное связывание, захват молекул жира и вкусоароматических соединений	Хлебобулочные изделия с пониженным содержанием жира, пончики и пышки	Яичный и молочный белки, белки злаковых культур

Таблица 5.12
Связь между физико-химическими и функциональными свойствами белков в пищевых продуктах

Базовые свойства	Функциональные свойства
Гидратация	Растворимость, диспергируемость, смачиваемость, набухание, загустевание, влагоудерживающая способность (ВУС)
Поверхностная активность	Эмульгирующие и пенообразующие свойства, связывание вкусоароматических и красящих соединений
Гидродинамические (реологические)	Пластичность, вязкость, когезионная способность, разжевываемость, адгезия, липкость, геле- и тестообразование, текстуризация

то что эти белки также представляют собой смесь нескольких белков, они не столь функциональны, как животные белки. Конкретные молекулярные особенности белков, отвечающих за различные характерные свойства продуктов, изучены еще недостаточно.

К физическим и химическим свойствам, обусловливающим характерные функциональные свойства белков, относятся размер и форма их молекул, состав аминокислот и их последовательность, общий заряд и его распределение, соотношение гидрофобность/гидрофильность, наличие вторичных, третичных и четвертичных структур, гибкость или жесткость молекулы, а также способность взаимодействовать с другими компонентами. Так как белки обладают многими свойствами, описать роль каждого из этих свойств применительно к конкретной функции довольно сложно.

Эмпирически различные функциональные свойства белков можно рассматривать как проявление трех молекулярных аспектов: гидратации, поверхностных и гидродинамических (реологических) свойств (табл. 5.12). Хотя о физико-химических свойствах некоторых белков известно уже довольно много, прогнозирование их функциональных свойств на основе молекулярных возможно далеко не всегда. В модельных системах белков установлены некоторые эмпирические соотношения между их молекулярными и функциональными свойствами, однако такие модельные системы не всегда правильно отражают реальное поведение белков в пищевых продуктах. Это проявляется, в частности, и в денатурации белков. Степень денатурации зависит от значений pH, температуры, других технологических параметров, а также от характеристик продукта. Как правило, в реальных продуктах белок взаимодействует со многими другими ингредиентами — жирами, сахарами, полисахаридами, солями и минорными компонентами, которые изменяют функциональные свойства белков. Несмотря на эти трудности, в понимании взаимосвязи различных физико-химических свойств белковых молекул и функциональными свойствами белков достигнут значительный прогресс.

5.5.1. Гидратация белка

Важнейшим компонентом пищевых продуктов является вода. Реологические свойства и текстура пищевых продуктов во многом зависят от взаимодействия воды с другими ингредиентами, особенно с макромолекулами белков и полисахаридов. Под действием влаги физико-химические свойства белков меняются. Так, под пластифицирующим действием воды на полукристаллические и аморфные белки меняются температуры стеклования (см. главу 2) и денатурации (T_D). При температуре стеклования осуществляется переход хрупких аморфных твердых тел (типа стекла) в гибкое резиноподобное состояние, а при температуре плавления кристаллическое твердое тело приобретает разупорядоченную структуру.

Многие функциональные свойства белков (диспергируемость, смачиваемость, набухание, растворимость, загустевание (увеличение вязкости), влагоудерживающая способность, гелеобразование, коагуляция, эмульгирующие и пенообразующие свойства) зависят от взаимодействий белков с водой. В пищевых продуктах с небольшим или средним содержанием влаги (например, в хлебобулочных изделиях и продуктах из мясного фарша) способность белков связывать воду очень важна для потребительских свойств этих продуктов, а способность белков обеспечивать сбалансированность взаимодействий «белок–белок» и «белок–вода» очень важна для их гелеобразующих свойств.

Молекулы воды связываются в белках с несколькими группами. К таким группам относятся группы, несущие электрический заряд (ион-дипольные взаимодействия), пептидные группы каркаса, амидные группы *Asn* и *Gln*, гидроксильные группы *Ser, Thr* и *Tyr*-остатков (диполь-дипольные взаимодействия),

а также неполярные замещенные группы (взаимодействия «диполь–индуцированный диполь» и гидрофобная гидратация).

Влагосвязывающую способность белков определяют в граммах связанной воды на грамм белка при насыщении обезвоженного белка водяным паром при относительной влажности 90–95%. Данные по этой влагосвязывающей способности (иногда ее называют гидратационной способностью) различных полярных и неполярных аминокислотных остатков белков приведены в табл. 5.13 [70]. Аминокислотные остатки с заряженными группами связывают примерно 6 М воды на один заместитель, незаряженные полярные остатки — примерно 2 М на остаток, а неполярные группы — примерно 1 моль на остаток. Гидратационная способность белков обусловлена их аминокислотным составом — чем больше заряженных остатков, чем выше гидратационная способность, которую можно рассчитать по аминокислотному составу с использованием эмпирического уравнения [71]:

$$A = f_C + 0{,}4f_P + 0{,}2f_N, \tag{5.47}$$

где a — это г воды/г белка; f_C, f_P, и f_N — это соответственно доли заряженных, полярных и неполярных остатков у белков.

Экспериментально полученные величины гидратационной способности некоторых глобулярных белков хорошо согласуются с рассчитанными по вышеприведенному уравнению, но расходятся со значениями для олигомерных белков. Так как олигомерные структуры включают частично «заглубленные» участки поверхности белка на границе раздела «субъединица–субъединица», рассчитанные значения обычно больше экспериментальных. С другой стороны, экспериментальные значения гидратационной способности казеиновых мицелл (около 4 г воды/г белка) намного превышают данные расчета, что объясняется огромными пустотами в структуре казеиновых мицелл, поглощающими воду под действием капиллярных сил и путем физического захвата.

На макроскопическом уровне связывание воды с белком происходит постепенно. Ионные группы с высоким сродством сольватируются первыми при низкой активности воды, после чего сольватируются полярные и неполярные группы. Последовательность стадий при увеличении активности воды представлена на рис. 5.19 ([109]; см. также главу 2). Изотермы сорбции белков, то есть количество связанной воды на 1 г белка как функция относительной влажности, имеют вид сигмоидальной кривой (см. главу 2). У большинства белков насыщенный монослой гидратационной воды образуется при значениях активности воды (a_w) около 0,7–0,8, а мультислои воды образуется при $a_w > 0{,}8$. Насыщенный монослой воды сначала связывается с ионными, полярными и неполярными группами на поверхности белка. Эта вода не замерзает и не действует в химических реакциях как растворитель, так что зачастую ее называют «связанной водой»,

Таблица 5.13
Гидратационная способность аминокислотных остатков[a]. По [70]

Аминокислотные остатки	Гидратация, H_2O/остаток, М/М	Аминокислотные остатки	Гидратация, H_2O/остаток, М/М
Полярные		***Ионные***	
Asn	2	Asp^-	6
Gln	2	Glu^-	7
Pro	3	Tyr^-	7
Ser, The	2	Arg^+	3
Trp	2	His^+	4
Asp (неионизированный)	2	Lys^+	4
Glu (неионизированный)	2	***Неполярные***	
Tyr	3	*Ala*	1
Arg (неионизированный)	3	*Gly*	1
Lys (неионизированный)	4	*Phe*	0
		Val, Ile, Leu, Met	1

[a] Отражает незамороженную воду, связанную с аминокислотными остатками; по данным ЯМР-анализа полипептидов.

что следует понимать как «вода с ограниченной подвижностью». При гидратации с 0,07 до 0,27 г/г энергия, необходимая для десорбции воды от поверхности белка, составляет при температуре при 25 °С около 0,18 ккал/моль, тогда как кинетическая энергия воды при 25 °С — около 1 ккал/моль, что больше, чем свободная энергия десорбции, и поэтому молекулы воды в монослое умеренно подвижны.

При значении a_w 0,9 белки связывают около 0,3–0,5 г воды/г белка (табл. 5.14) [65, 71]. При $a_w > 0{,}9$ жидкая (объемная) вода конденсируется в изломах и углублениях молекул белка или в капиллярах нерастворимых белковых систем типа миофибрилл. Свойства такой воды не отличаются от свойств объемной воды. Такую воду называют гидродинамической, и она перемещается вместе с молекулой белка.

На связывание воды белками влияют такие условия окружающей среды, как pH, ионная сила, температура, тип соли и конформация белка. Белки меньше всего гидратированы в их изоэлектрической точке, когда усиленные взаимодействия «белок–белок» обусловливают минимальное взаимодействие с водой. Выше и ниже изоэлектрической точки из-за увеличения общего заряда и сил отталкивания белки набухают и связывают больше воды. Способность большинства белков связывать воду при значениях pH 9–10 выше, чем при любом другом pH, что объясняется ионизацией сульфгидрильного и тирозинового остатков. При pH более10 положительный заряд ε-аминогрупп лизильных остатков утрачивается, что приводит к уменьшению связывания воды.

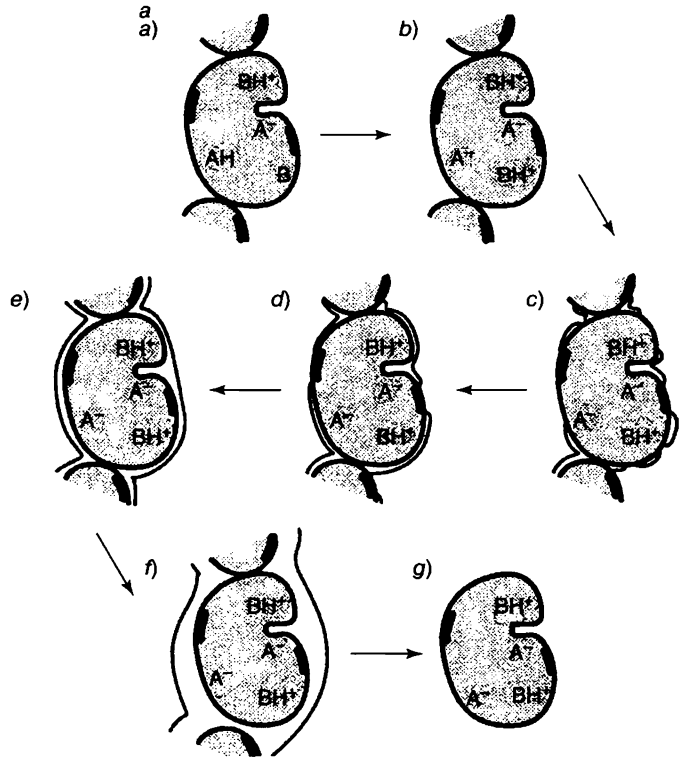


Рис. 5.19. Последовательность стадий гидратации белка: *a* — негидратированный белок; *b* — начальная гидратация заряженных групп; *c* — образование кластеров воды вблизи полярных и заряженных частиц; *d* — завершение гидратации на полярных поверхностях; *e* — гидрофобная гидратация неполярных участков, завершение гидратационного монослоя; *f* — образование мостиков между водой, связанной с белком, и объемной водой; *g* — завершение гидродинамической гидратации. По [109]

Соли в низкой концентрации (< 0,2 М) усиливают связывание воды белками, что объясняется гидратацией ионов соли, особенно анионов, связанных со слабозаряженными белковыми группами. При такой низкой концентрации связывание ионов с белками не влияет на гидратационный слой заряженных групп белка, и усиление связывания воды приходится на воду, связанную с ионами. При высокой концентрации соли с ионами соли связывается почти вся вода, что приводит к гидратации белка.

При повышении температуры связывание воды белками снижается, так как ослабляется водородное связывание и уменьшается гидратация ионных групп. Связывание воды денатурированными белками на 10% выше, чем нативными, что является следствием увеличения площади поверхности относительно массы с выходом на поверхность некоторых «заглубленных» до этого гидрофобных групп. Если при денатурации происходит агрегация белка, то связывание воды снижается вследствие замещения воды усиленными взаимодействиями «белок–белок». Денатурированные пищевые белки обычно характеризуются низкой растворимостью в воде, однако их влагосвязывающая способность (ВСС) не слишком отличается от ВСС нативного белка. Из-за этого показатель ВСС нельзя использовать для прогнозирования растворимости белков, которая зависит не только от ВСС, но и от других термодинамических факторов.

В производстве пищевых продуктов намного важнее показатель влагоудерживающей способности (ВУС). Понятие ВУС относится к способности белков поглощать и удерживать воду, противодействуя гравитационным силам внутри белкового матрикса (белкового геля, мышечной ткани животных и рыб). Та-

кая вода представляет собой сумму связанной, гидродинамической и физически захваченной воды, однако исследования показали, что ВУС положительно коррелирует с ВСС. Способность белков захватывать воду обусловливает сочность и мягкость продуктов из мясного фарша и желаемую текстуру хлебобулочных и гелеподобных продуктов.

5.5.2. Растворимость

Функциональные свойства белков, особенно загущающие, пенообразующие, эмульгирующие и гелеобразующие, во многом зависят от растворимости. Нерастворимые белки используются в производстве пищевых продуктов очень редко. Растворимость белка представляет собой отражение термодинамического равновесия во взаимодействиях «белок–белок» и «белок–растворитель»:

«Белок–белок» + Вода ⇔ «Белок–вода». (5.48)

Таблица 5.14

Гидратационная способность некоторых белков. По [65, 71]

Белок	г воды/г белка
Чистые белки[a]	
рибонуклеаза	0,53
лизоцим	0,34
миоглобин	0,44
β-лактоглобулин	0,54
Химотрипсиноген	0,23
сывороточный альбумин	0,33
гемоглобин	0,62
коллаген	0,45
казеин	0,40
овальбумин	0,30
Белковые препараты промышленного изготовления[b]	
концентраты сывороточного белка КСБ	0,45–0,52
казеинат натрия	0,38–0,92
соевый белок	0,33

[a] При ОВ 90%.
[b] При ОВ 95%.

На растворимость белков взаимодействия влияют ионной и гидрофобной природы. Гидрофобные взаимодействия способствуют взаимодействиям «белок–белок» и уменьшают растворимость, а ионные способствуют взаимодействиям «белок–вода» и повышают растворимость. Ионные остатки характеризуются двумя видами сил отталкивания между молекулами белка в растворе — к первым относятся силы электростатического отталкивания между молекулами, обладающими общим положительным или отрицательным зарядом при любых значениях pH, отличающихся от изоэлектрической точки, а ко вторым — силы отталкивания между гидратационными оболочками вокруг ионных групп..

В работе [11] было высказано предположение, что растворимость белка фундаментально связана со средней гидрофобностью аминокислотных остатков и частотой встречаемости данного заряда. Средняя гидрофобность определяется как

$$\Delta G = \Sigma \Delta g_{ост}/n, \tag{5.49}$$

где $\Delta g_{ост}$ — гидрофобность отдельной аминокислотной группы цепи, рассчитанная по изменению свободной энергии при переходе из октанола в воду (см. раздел 5.2.1.4); n — общее количество остатков в данном белке. Частота встречаемости заряда определяется как

$$\sigma = \frac{(n^+ + n^-)}{n}, \tag{5.50}$$

где n^+ и n^- — количество положительных и отрицательно заряженных остатков соответственно; n — общее число остатков.

Согласно [11], чем меньше средняя гидрофобность и больше частота встречаемости заряда, тем больше растворимость белка. Это эмпирическое соотношение верно для большинства белков, но не для всех. Растворимость белка связана с гидрофобностью и гидрофильностью поверхности молекулы белка, контактирующей с окружающей водой, а не средней гидрофобностью и частотой встречаемости заряда в целом. Поскольку большинство гидрофобных остатков «заглублены» внутрь молекулы белка, на растворимость влияют неполярные группы на ее поверхности, и чем меньше на поверхности гидрофобных участков, тем выше растворимость.

По характеристикам растворимости белки делят на четыре категории:

альбумины, растворимые в воде при pH 6,6 (например, сывороточный белок, овальбумин и α-лактальбумин);

глобулины, растворимые в разбавленных солевых растворах при pH 7,0 (например, глицинин, фазеолин и β-лактоглобулин);

глютелины, растворимые только в кислотах (pH 2) и щелочах (pH 12) (например, глютелины пшеницы);

проламины, растворимые в 70%-ном этаноле (например, зеин и глиадин).

Проламины и глютелины представляют собой сильно гидрофобные белки.

Помимо этих внутренне присущих белкам физико-химических свойств на растворимость влияют условия раствора — значение pH, ионная сила, температура и присутствие органических растворителей.

5.5.2.1. Значение pH

При значениях pH выше и ниже изоэлектрической точки белки имеют общий положительный или отрицательный заряд. Солюбилизации белков способствуют также силы электростатического отталкивания и гидратация несущих заряд остатков. При построении зависимости «растворимость – значение pH» у большинства белков получается U-образная кривая. Минимум растворимости приходится на изоэлектрическую точку белков. Большинство пищевых белков имеют кислотную природу, то есть суммарное число остатков *Asp* и *Glu* больше, чем суммарное число *Lys, Arg* и *His*-остатков. Следовательно, минимум растворимости приходится на значение pH 4–5 (изоэлектрическая точка), а максимум — на щелочные значения pH. Минимальная растворимость вблизи изоэлектрической точки объясняется преимущественно недостаточными силами электростатического отталкивания, что приводит к агрегации и осаждению посредством гидрофобных взаимодействий. Некоторые пищевые белки, в частности β-лактоглобулин (pI 5,2) и бычий сывороточный альбумин (pI 5,3), в изоэлектрической точке хорошо растворимы. У этих белков на поверхности молекулы велико соотношение числа гидрофильных остатков и числа неполярных групп. Не следует забывать, что хотя белки при pI электрически нейтральны, на поверхности их молдекулы имеется равное число положительных и отрицательных зарядов, что обусловливает гидрофильность белков. Если гидрофильность и силы гидратационного отталкивания, возникающие из-за наличия заряженных остатков, превышают гидрофобные взаимодействия «белок–белок», то белок в изоэлектрической точке растворим.

Поскольку большинство белков хорошо растворимы при щелочных значениях pH (8–9), экстракцию белков из растительного сырья (например, из соевой муки) можно проводить при этих значениях pH. Технологическая схема типичного процесса получения изолята соевого белка на основе показателей «pH–растворимость» приведена на рис. 5.20.

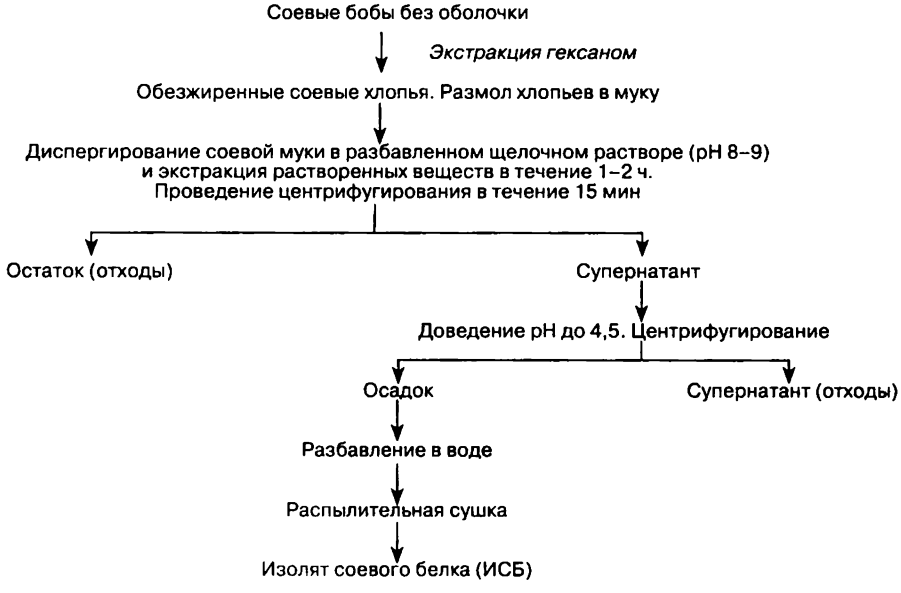


Рис. 5.20. Типичная технологическая схема процесса извлечения белка из соевой муки

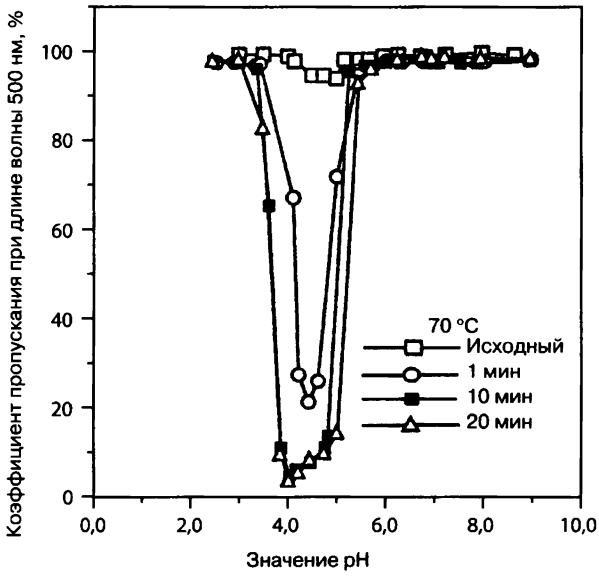


Рис 5.21. Кривая «pH–растворимость» растворов изолята белка сыворотки, нагреваемых до 70 °С за различное время. По [135]

При тепловой денатурации профиль кривой «pH–растворимость» у белков меняется (рис. 5.21). Натуральный изолят белка сыворотки (ИБС) при pH 2–9 полностью растворим, но при нагревании до 70 °С в течение 1–10 мин он дает обычную U-образную кривую растворимости с минимумом при pH 4,5. Эти изменения кривой растворимости при тепловой денатурации вызываются увеличением гидрофобности поверхности белковой молекулы вследствие ее раскручивания, что, в свою очередь, изменяет равновесие во взаимодействиях «белок–белок» и «белок-растворитель» в пользу первого.

5.5.2.2. Ионная сила

Ионная сила солевого раствора вычисляется по уравнению

$$\mu = 0{,}5\sum C_i Z_i^2, \qquad (5.51)$$

где C_i — концентрация данного иона; Z_i — его валентность.

При малой ионной силе (< 0,5) ионы нейтрализуют заряды на поверхности молекул белков. Такой эффект экранирования заряда влияет на растворимость двумя разными способами в зависимости от характеристик поверхности молекулы белка. Для белков с большой долей неполярных участков растворимость уменьшается, а для белков с небольшой их долей она увеличивается. Первый тип характерен для соевых белков, а второй — для β-лактоглобулина. Если снижение растворимости связано с усилением гидрофобных взаимодействий, то ее увеличение — с повышением ионной активности макроионов белков. При ионной силе выше 1 соли действуют на растворимость белков специфически. По мере увеличения концентрации соли сульфаты и фториды снижают растворимость (высаливание), а бромиды, йодиды, тиоцианаты и перхлораты ее повышают (всаливание). При постоянной ионной силе относительная эффективность различных ионов относительно растворимости соответствует ряду Гофмейстера по анионам, повышающим растворимость ($SO_4^{2-} < F^- < Cl^- < Br^- < I^- < ClO_4^- < SCN^-$), и катионам, ее уменьшающим ($NH_4^+ < K^+ < Na^+ < Li^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+}$). Такое действие аналогично влиянию соли на термическую денатурацию белков (см. раздел 5.4).

В общем случае растворимость белков в солевых растворах подчиняется уравнению

$$\log\left(\frac{S}{S_0}\right) = \beta - K_S C_S, \qquad (5.52)$$

где S и S_0 — растворимость данного белка соответственно в солевом растворе и воде; K_S — коэффициент высаливания; C_S — молярная концентрация соли; β — константа для данного белка; для высаливающих солей значение K_S положительно, а для всаливающих — отрицательно.

5.5.2.3. Температура

При постоянных температуре и ионной силе растворимость большинства белков в диапазоне температур 0...40 °С увеличивается. Исключение составляют сильно гидрофобные белки типа β-казеина и некоторые белки злаковых культур. При температуре выше 40 °С увеличение термической кинетической энергии приводит к «раскручиванию» структуры молекулы белков (денатурации), выходу наружу неполярных групп, агрегации и осаждению, то есть к снижению растворимости.

5.5.2.4. Присутствие органических растворителей

Добавление таких органических растворителей, как этанол или ацетон, снижает диэлектрическую постоянную водной среды и усиливает внутри- и межмолекулярные электростатические силы (как притяжения,

так и отталкивания), что вызывают «раскручивание» молекул белка. У молекулы в денатурированном состоянии низкая диэлектрическая постоянная среды способствует межмолекулярному водородному связыванию «выступающих наружу» пептидных групп и межмолекулярному электростатическому притяжению групп с противоположным зарядом. Такое взаимодействие приводит к осаждению белков в органических растворителях и уменьшению растворимости в водной среде. При осаждении в органических растворителях гидрофобные взаимодействия играют минимальную роль из-за эффекта солюбилизации органических растворителей на неполярные группы (исключение составляют белки проламинового типа, которые настолько гидрофобны, что растворимы только в 70%-ном этаноле).

Так как растворимость белков связана с их структурным состоянием, показатель растворимости зачастую используют как меру денатурации белков при экстракции, выделении и очистке, а также как показатель применимости белков. Растворимость промышленно выпускаемых белковых концентратов и изолятов варьирует в широком диапазоне. Растворимость белковых препаратов выражают в виде *показателя растворимости* белка (ПРБ) или *показателя диспергируемости белка* (ПДБ). Оба эти показателя отражают долю растворимых белков в образце. ПРБ промышленно выпускаемых белковых изолятов белков варьирует от 25 до 80%.

5.5.3. Поверхностно-активные свойства белков

Некоторые натуральные и переработанные пищевые продукты представляют собой пену либо эмульсию. Эти типы дисперсных систем нестабильны без внесения на границу раздела фаз соответствующего амфифильного вещества (см. главу 13). Молекулы белков амфифильны и спонтанно мигрируют к границе раздела фаз «воздух–вода» или «масло–вода». Такая спонтанная миграция из жидкости к границе раздела фаз свидетельствует, что свободная энергия белков на этой границе меньше, чем в объемной водной фазе. При установлении состояния равновесия концентрация белка не границе раздела фаз всегда будет больше, чем в объемной водной фазе. В отличие от низкомолекулярных ПАВов белки образуют на границе раздела фаз вязкоэластичные пленки, способные противостоять механическим воздействиям при хранении и обработке. Стабилизированные белками пены и эмульсии более стабильны, чем обработанные низкомолекулярными ПАВами, благодаря чему белки нашли здесь широкое применение.

Хотя все белки амфифильны, они значительно различаются по своей поверхностной активности, что нельзя отнести на счет различий в соотношении гидрофобных и гидрофильных остатков. Если бы доминирующим фактором в определении поверхностной активности белков была большая разница в отношении «гидрофобность/гидрофильность», то растительные белки с более чем 40% гидрофобных аминокислотных остатков проявляли бы лучшие поверхностно-активные свойства, чем альбуминоподобные белки (овальбумин и бычий сывороточный альбумин) с менее чем 30% гидрофобных аминокислотных остатков. Вместе с тем у этих животных белков эмульгирующие и пенообразующие свойства лучше, чем у соевого и других растительных белков. Кроме того, средняя гидрофобность большинства белков попадает в довольно узкий диапазон, но при этом различия в их поверхностной активности довольно велики. Эти различия в поверхностной активности следует, в первую очередь, отнести к разнице в конформации белков. К таким конформационным факторам относятся стабильность и гибкость полипептидной цепи, легкая адаптация к изменениям условий среды, а также модель распределения гидрофильных и гидрофобных групп на поверхности молекулы белка. Все эти факторы взаимосвязаны и совместно обусловливают сильное влияние на поверхностно-активнные свойства белков.

Известно, что белки с желаемыми поверхностно-активными свойствами должны быть способны:

- быстро адсорбироваться к границе раздела фаз;
- быстро «раскручиваться» на границе раздела фаз и переориентироваться;
- взаимодействовать на границе раздела фаз с соседними молекулами и образовывать стабильную когезионную вязкоэластичную пленку, противодействующую механическим и термическим воздействиям [31].

Для образования и стабилизации пен и эмульсий необходимо присутствие ПАВа, способного уменьшить поверхностное натяжение между водной и воздушной (жировой) фазами. Для этого используют либо низкомолекулярные ПАВы типа лецитина, моноацилглицерина и т. п. или высокомолекуляные бел-

ки. При равной концентрации на границе раздела фаз белки менее эффективны относительно уменьшения поверхностного натяжения, чем низкомолекулярные ПАВы. Обычно большинство белков снижают поверхностное натяжение в насыщенном монослое на границе раздела фаз «воздух–вода» или «масло–вода» примерно на 15 мН/м, а низкомолекулярные ПАВ — на 30–40 мН/м. Неспособность белков сильно снижать поверхностное натяжение объясняется их сложной структурой. Несмотря на то что в структуре белков присутствуют и гидрофильные, и гидрофобные группы, у этих групп нет четкой гидрофильной головки и гидрофобного хвоста, как у лецитина или моноацилглицерина. Эти группы в первичной структуре распределены неупорядоченно, а в четвертичной свернутой конформации некоторые гидрофобные остатки образуют на поверхности молекулы белка отдельные участки, а большинство гидрофобных остатков «заглублены» внутрь молекулы.

Модель распределения гидрофильных и гидрофобных участков по поверхности молекулы белка влияет на скорость адсорбции на границе раздела фаз «воздух–вода» и «масло–вода». Если поверхность молекулы белка очень гидрофильна и содержит небольшое количество гидрофобных участков, то закрепления белка на границе раздела фаз может не происходить, поскольку в водной фазе поверхность молекулы будет иметь меньшую свободную энергию, чем на границе раздела фаз. По мере увеличения числа гидрофобных участков спонтанная адсорбция к границу раздела фаз становится более вероятной (рис. 5.22) [26].

Только гидрофобные остатки, случайным образом распределенные по поверхности молекулы белка, не образуют ни гидрофобного участка («пятна»), ни обладают достаточной энергией для закрепления белка на границе раздела фаз. Даже если неполярные остатки занимают более чем 40% доступной поверхности обычного глобулярного белка, они не увеличат адсорбцию до тех пор, пока они не агрегируются. Другими словами, характеристики поверхности молекулы белка существенно влияют на способность белка спонтанно адсорбироваться к границе раздела фаз и на их эффективность как стабилизаторов дисперсий.

Адсорбция белков к границе раздела фаз отличается от адсорбции низкомолекулярных ПАВ. У таких ПАВ, как фосфолипиды и моноацилглицерины, отсутствует конформационное сопротивление адсорбции и ориентации, поскольку гидрофильные и гидрофобные участки находятся на разных сторонах молекулы. У белков же распределение гидрофильных и гидрофобных участков на поверхности молекулы и ее структурная жесткость препятствует адсорбции и ориентации. Из-за объемной природы свернутой молекулы белка однажды адсорбированные молекулы остаются в объемной фазе, и лишь малая их доля закрепляется на границе раздела фаз (рис. 5.23). Сила сцепления таких «закрепленных» молекул зависит от количества закрепленных пептидных сегментов и энергии взаимодействия между этими сегментами и границей раздела фаз. Белок закрепится на границе только в том случае, если сумма изменения негативной свободной энергии взаимодействия сегментов намного превышает тепловую кинетическую энергию молекулы белка. Количество пептидных сегментов, закрепившихся на границе раздела фаз, зависит, в частности, от конформационной гибкости молекулы. Такие очень гибкие молекулы, как казеин, при адсорбции на межфазной границе могут быстро изменять конформацию, позволяя связываться с границей раздела фаз дополнительным сегментам полипептидов. Жесткие глобулярные белки, например лизоцим и соевый белок, не проявляют на границе раздела фаз существенных конформационных изменений.

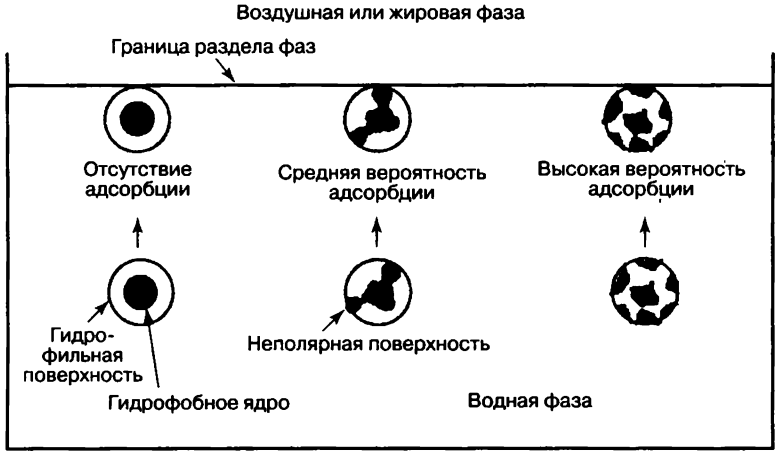


Рис. 5.22. Схематическое изображение влияния гидрофобных участков поверхности молекулы белка на вероятность адсорбции белков к границе раздела фаз «воздух-вода». По [26]

Полипептидные цепи на межфазной границе принимают три различные конфигурации: «цепочки», «петли» и «хвосты» (рис. 5.24) [26]. Цепочки — это сегменты, полностью находящиеся на границе раздела фаз, петли — это сегменты полипептидов,

суспендированные в водную фазу, а хвосты — это N- и С-концевые сегменты белков, обычно расположенные в водной фазе. Относительное распределение этих трех конфигураций зависит от конформационных характеристик белков. Чем больше доля полипептидных сегментов в цепочечной конфигурации, тем сильнее связывание и тем меньше поверхностное натяжение.

Единственным значимым показателем, влияющим на поверхностно-активные свойства белков, является их молекулярная гибкость, помогающая быстро менять конформацию при миграции из одной среды в другую (например, из объемной водной фазы на границу раздела фаз).В качестве меры молекулярной гибкости зачастую используют адиабатическую сжимаемость белков. Исследования разных по структуре белков показали, что динамика поверхностно-активных свойств белков, то есть уменьшение поверхностного натяжения под действием 1 мг белка на 1 см^2 при адсорбции из объемной фазы к границе раздела фаз «воздух–вода», имеет линейную положительную корреляцию с адиабатической сжимаемостью белков (рис. 5.25) [106]. Быстрое конформационное изменение на границе раздела фаз весьма существенно для переориентации гидрофобных и гидрофильных остатков по направлению к жировой и водной фазам и для обеспечения максимального контакта и распределения остатков в этих двух фазах, что обеспечивает быстрое снижение поверхностного натяжения, особенно на начальной стадии образования эмульсии.

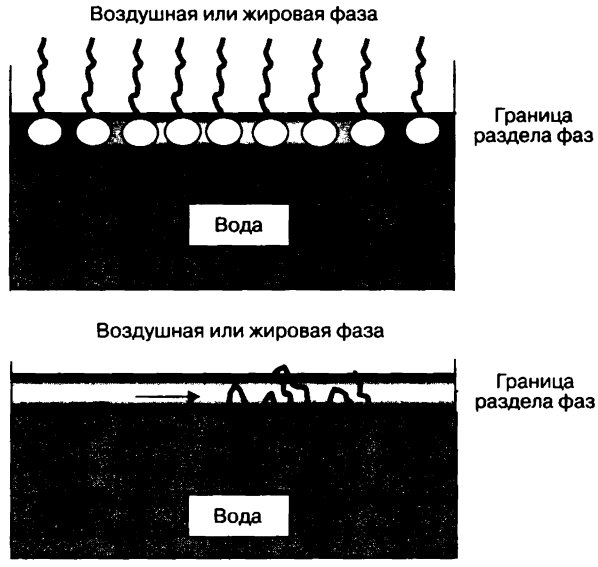


Рис. 5.23. Различие в адсорбции низкомолекулярных ПАВ (сверху) и белков (снизу) на границе раздела фаз «воздух–вода» или «масло–вода»

Механическая прочность белковой пленки на границе раздела фаз зависит от межмолекулярных когезионных взаимодействий, к которым относятся электростатические силы, силы водородного связывания и гидрофобные взаимодействия. Кроме того, межфазная полимеризация адсорбированных белков через дисульфидные и сульфгидрильные реакции улучшают вязкоэластичные свойства. Концентрация белка в межфазной пленке составляет около 20–25 %масс/об., причем белок находится почти в гелеподобном состоянии. Для стабильности и вязкоэластичности этой гелеподобной пленки очень важна сбалансированность различных нековалентных взаимодействий. Например, при слишком сильных гидрофобных взаимодействиях могут произойти межфазная агрегация, коагуляция, и, возможно, осаждение белка, что отрицательно сказывается на целостности пленки. Если силы электростатического отталкивания намно-

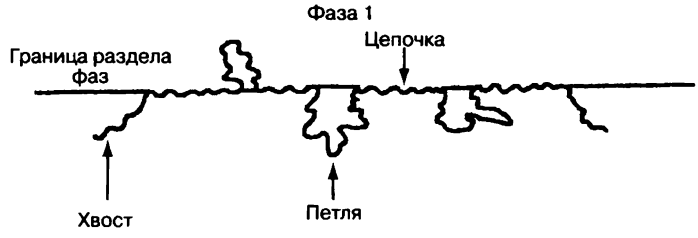


Рис 5.24. Различные конфигурации гибких полипептидов на границе раздела фаз. По [26]

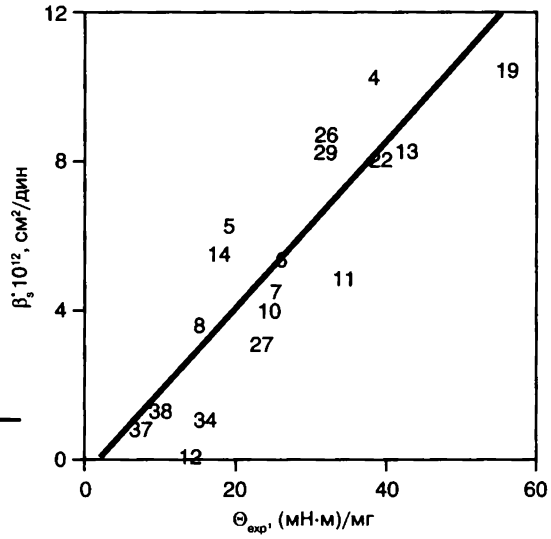


Рис. 5.25. Корреляция между адиабатической сжимаемостью и поверхностно-активными свойствами белков. Цифрами обозначены отдельные белки (подробнее об этом см. работу [106])



Рис. 5.26. Различные молекулярные процессы в белковой пленке на границе раздела фаз

го превышают силы притяжения, то это препятствует образованию толстой когезионной пленки. Это означает, что должен существовать некий баланс между силами притяжения и отталкивании с одной стороны, и гидратацией для образования стабильной вязкоэластичной пленки, с другой. Различные молекулярные процессы в ходе адсорбции и образования белковой пленки на границе раздела фаз представлены на рис. 5.26.

Те же принципы лежат в основе образования и стабильности пен и эмульсий, однако из-за различий в энергетике границ раздела фаз на этих границах необходимо проявление других функций белков. Другими словами, белки, являющиеся хорошими эмульгаторами, могут не быть хорошими пенообразователями.

Следует осознавать, что на границе раздела фаз поведение белков очень сложно и изучено еще недостаточно, в связи с чем последующее изложение эмульгирующих и пенообразующих свойств пищевых белков будет иметь, как правило, описательный характер.

5.5.3.1. Эмульгирующие свойства

Физико-химическим основам образования эмульсий и факторам, определяющим взбиваемость, флокуляцию, коалесценцию и стабильность пищевых продуктов, посвящена глава 13.

Некоторые натуральные и переработанные пищевые продукты (молоко, кокосовое и соевое молоко, яичный желток, сливочное масло, маргарины, майонезы, спреды, замороженные десерты, сосиски и колбасные изделия, кексы и пирожные) являются продуктами эмульсионной природы, и в них белок выполняет функцию эмульгатора. В натуральном молоке мембраны жировых глобул состоят из липопротеинов, стабилизирующих глобулы жира. В гомогенизированном молоке белковая пленка состоит из казеиновых мицелл, а липопротеиновые мембраны заменены сывороточными белками. Гомогенизированное молоко более стойко к взбиванию, чем натуральное, поскольку пленка из казеиновых мицелл и сывороточных белков более стойкая, чем натуральные липопротеиновые мембраны.

5.5.3.1.1. Методы определения эмульгирующих свойств белков

Эмульгирующие свойства пищевых белков оценивают разными методами, в частности, путем определения распределения размеров образованных жировых капель, эмульгирующей способности, эмульгируемого объема (ЭО) и стабильности эмульсии.

Показатель эмульгирующей способности. Физические и органолептические свойства эмульсий, стабилизированных белками, зависят от размера образованных капель и общей площади поверхности образовавшейся границы раздела фаз. Средний размер капель в эмульсиях определяется методами световой микроскопии (этот метод не очень надежен), электронной микроскопии, светорассеяния (фотонной корреляционной спектроскопии) или с использованием счетчика Коултера (*Coulter*). Зная размер капель, общую площадь поверхности раздела фаз можно получить из уравнения

$$A = \frac{3\phi}{R}, \tag{5.53}$$

где ϕ — объемная доля дисперсионной фазы (жира); R — средний радиус частиц эмульсии.

Если массу белка обозначить m, то показатель эмульгирующей способности (ПЭС), то есть площадь раздела фаз, приходящаяся на единицу массы белка, рассчитывается как

$$A = \frac{3\phi}{Rm}. \tag{5.54}$$

Другой простой и более практичный метод определения ПЭС — это турбидиметрический метод [99]. Мутность эмульсии (T) вычисляется по формуле

$$T = \frac{2{,}303A}{l}, \tag{5.55}$$

где A — светопоглощение; l — длина пути луча света.

Согласно теории светорассеяния Ми (*Mie)* площадь границы раздела фаз равна удвоенной мутности. Если ϕ — это объемная доля жира, а C — масса белка в единице объема водной фазы, то ПЭС определяется как

$$\text{ПЭС} = \frac{2T}{(1-\phi)C}. \tag{5.56}$$

Следует отметить, что в работе [99] вместо $(1 - \phi)$ в знаменателе вышеприведенного уравнения используется ϕ. Это уравнение верно, так как ϕ означает объемную долю жира, и таким образом произведение $(1 - \phi)C$ — это общая масса белка в единице объема эмульсии [17]. Хотя этот метод довольно прост и практичен, недостатком его является то, что он основан на измерении при единственной длине волны (500 нм). Поскольку мутность пищевых продуктов зависит от длины волны, то рассчитанная площадь граница раздела фаз при длине волны 500 нм не совсем точна, то есть использование этого уравнения для оценки среднего диаметра частиц или их количества в эмульсии в результате оказывается не совсем надежным. Вместе с тем его вполне можно использовать для качественного сравнения эмульгирующей способности различных белков и изменений в эмульгирующей способности данного белка при различных способах обработки.

Белковая нагрузка. Стабильность эмульсии зависит от количества белков, адсорбированных в эмульсии на границе раздела фаз «масло—вода». Для определения количества адсорбированного белка эмульсию центрифугируют, отделяют водную фазу, а взбитую часть (пену) отмывают и повторно центрифугируют для удаления оставшегося адсорбированного белка. Количество белка, адсорбированного на частицах эмульсии, определяется по разнице между общим количеством первоначально присутствовавшего в эмульсии белка, и количеством белка, оставшегося в жидкости от взбитой части. Зная общую площадь границы раздела фаз эмульсии, можно вычислить количество адсорбированного белка на 1 м^2 этой площади. Обычно белковая нагрузка составляет 1–3 мг/м^2. По мере увеличения объемной доли жировой фазы белковая нагрузка при постоянном содержании белка в эмульсии снижается. Для эмульсий с высоким содержанием жира и с каплями небольшого размера для покрытия поверхности раздела фаз и стабилизации эмульсии требуется больше белка.

Эмульгируемый объем (ЭО) — это объем жира (см^3), который можно эмульгировать одним граммом белка до инверсии фаз (изменения эмульсии «масло-в-воде» на эмульсию «вода-в-масле»). При данном методе масло или растопленный жир добавляют (при постоянной скорости и температуре) в непрерывно перемешиваемый водный раствор белка. Момент инверсии фаз определяют по резкому изменению вязкости или цвета (обычно в масло добавляют краситель), а также по увеличению электрического сопротивления. Для стабилизированных белками эмульсий фазовая инверсия наступает, когда ϕ достигает значения примерно 0,65–0,85. Инверсия фаз — процесс не мгновенный, ему предшествует образование двойной эмульсии «вода-в-масле-в воде». Так как ЭО выражается через объем эмульгированного жира на грамм белка, он увеличивается с уменьшением концентрации белка до значения, когда неадсорбированный белок накапливается в водной фазе. Для сравнения ЭО различных белков строят зависимость ЭО от концентрации белка.

Стабильность эмульсии. Стабилизированные белком эмульсии стабильны несколько суток, то есть обычно при хранении образца на воздухе не обнаруживается заметного разделения фаз. Для оценки стабильности эмульсии зачастую применяют хранение при повышенных температурах или центрифугирование. В последнем случае стабильность эмульсии выражается или как процент уменьшения площади раздела фаз (мутности), или как объемный процент отделенной взбитой части, или как содержание жира во взбитой части. Чаще всего стабильность эмульсии (СЭ) выражают как

$$\text{СЭ} = \frac{\text{Объем взбитого слоя}}{\text{Общий объем эмульсии}} \cdot 100, \tag{5.57}$$

где объем взбитого слоя вычисляют при стандартном центрифугировании (центрифугирование известного объема эмульсии в градуированной пробирке центрифуги, 1300 g в течение 5 мин). После этого измеряют объем отделенной взбитой части и выражают его в процентах от общего объема. Иногда для предотвращения коалесценции капель применяют более длительное центрифугирование при пониженных гравитационных нагрузках (180 g за 15 мин).

Для оценки стабильности эмульсии можно использовать и турбидиметрический метод (см. выше). В этом случае ее рассчитывают как *индекс стабильности эмульсии* (ИСЭ) — время достижения мутности данной эмульсии в два раза меньшей, чем исходная.

Методы определения стабильности эмульсий во многом носят эмпирический характер. Более научным количественным показателем является изменение площади границы раздела фаз со временем, но его трудно непосредственно измерить.

5.5.3.1.2. Факторы, влияющие на эмульгирование

На свойства эмульсий, стабилизированных белком, влияют несколько факторов — как внутренние (значение pH, ионная сила, температура, присутствие низкомолеуклярных ПАВ, сахаров, объемной жировой фазы, тип белка и точка плавления жира), так и внешние (тип оборудования, темпы подвода энергии и скорость сдвига). Стандартного метода для систематической оценки эмульгирующих свойств белков не существует, а значит, результаты, полученные в разных лабораториях, не подлежат точному сравнению. Это препятствует более точному пониманию молекулярных факторов, влияющих на эмульгирующие свойства белков.

Основные факторы, влияющие на образование и стабилизацию эмульсий, рассматриваются в главе 13, и ниже мы коснемся лишь молекулярных факторов, действующих в эмульсиях, стабилизированных белком.

Для эмульгирующих свойств важна растворимость, но 100%-ная растворимость является отнюдь не необходимым условием. Белки с крайне низкой растворимостью вообще не обладают эмульгирующей способностью, а в диапазоне растворимости 25–80% не существует надежного соотношения между растворимостью белка и его эмульгирующими свойствами [76]. Вместе с тем, поскольку стабильность белковой пленки на границе раздела фаз зависит от желаемых взаимодействий с жировой и водной фазой, то для эмульгирующих свойств необходима некоторая степень растворимости белка. Минимальное значение растворимости для различных белков разное. В эмульгированных мясных продуктах (например, сосисках) солюбилизация миофибриллярных белков в 0,5 М NaCl усиливает их эмульгирующие свойства. Некоторые коммерчески выпускаемые изоляты соевых белков, получаемые путем тепловой обработки, характеризуются слабыми эмульгирующими свойствами именно из-за их низкой растворимости.

Образование и стабильность эмульсий, стабилизированных белком, зависят от значения pH. Как правило, высокорастворимые в изоэлектрической точке белки (например, сывороточный альбумин, желатин и яичный белок) при этом значении pH характеризуются максимальной эмульгирующей способностью и ЭО. Отсутствие в изоэлектрической точке суммарного электрического заряда и сил электростатического отталкивания способствует максимальной белковой нагрузке на границе раздела фаз и образованию высокоэластичной пленки, что благоприятно сказывается на стабильности эмульсии. Вместе с тем отсутствие сил электростатического отталкивания между частицами эмульсии в некоторых случаях способствует флокуляции и коалесценции, что снижает стабильность эмульсии. Если же белок в изоэлектрической точке сильно гидролизован (что встречается довольно редко), то гидратационные силы отталкивания между частицами эмульсии могут предотвратить флокуляцию и коалесценцию, в результате стабилизируя эмульсию. Так как большинство белков (казеин, промышленно выпускаемые сывороточные белки, белки мяса, соевые белки) плохо растворимы и слабо гидратированы, а также у них отсутствуют силы электростатического отталкивания, то в изоэлектрической точке они являются плохими эмульгаторами.

Эмульгирующие свойства белков слабоположительно коррелируют с гидрофобностью поверхности (ккал/(моль · кол-во остатков). Способность различных белков снижать поверхностное натяжение на границе раздела фаз «масло–вода» и увеличивать ПЭС коррелирует со степенью гидрофобности поверхности их молекул (рис. 5.27), однако это корреляция далеко не безупречна. Эмульгирующие свойства некоторых белков (например, β-лактоглобулина, α-лактоальбумина и соевых белков) слабо коррелируют со степенью гидрофобности поверхности.

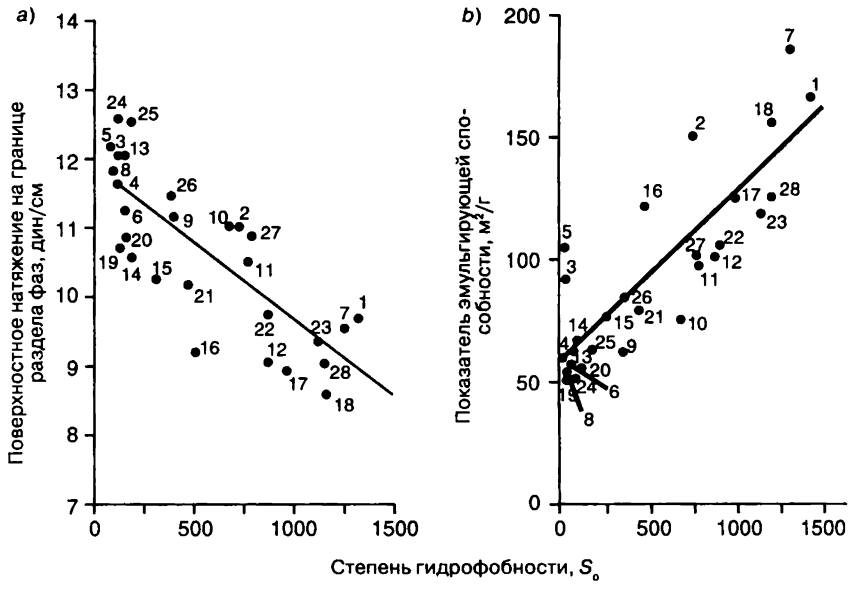


Рис 5.27. Корреляция степени гидрофобности поверхности различных белков с поверхностным натяжением на границе раздела фаз «масло–вода» (а) и ПЭС. Степень гидрофобности поверхности определяется по количеству связанных флуоресцентных меток на единицу массы белка. Цифры на графиках обозначают: 1 — бычий сывороточный альбумин; 2 — β-лактоглобулин; 3 — трипсин; 4 — овальбумин; 5 — кональбумин; 6 — лизоцим; 7 — к-казеин; 8–12 — денатурированный овальбумин при температуре 85 °С соответственно в течение 1, 2, 3, 4 и 5 мин; 13–18 — лизоцим, денатурированный при температуре 85 °С соответственно за 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мин; 19–23 — овальбумин, связанный с додецилсульфатом (соответственно, 0,2, 0,3, 1,7, 5,7 и 7,9 моль/моль белка; 24–28 — овальбумин, связанный с линолеатом (соответственно, 0,3, 0,9, 3,1, 4,8 и 8,2 моль/моль белка. По [62]

Степень гидрофобности поверхности белков обычно определяют путем измерения количества связанных с белком гидрофобных флуоресцентных меток (например, *цис*-паринаровой кислоты) [62]. Хотя этот метод и позволяет получить некоторую информацию о гидрофобности поверхности белка, возникает вопрос, действительно ли он отражает только «гидрофобность» его поверхности. На самом деле поверхностная гидрофобность определяется как доля неполярной поверхности белка, которая контактирует с окружающей объемной фазой воды, но *цис*-паринаровая кислота способна связываться только с гидрофобными пустотами, которые доступны для неполярных лигандов, но не доступны для молекул воды и любой из двух фаз эмульсии «масло-в-воде» (за исключением белков, способных быстро конформационно переориентироваться на границе раздела фаз). Слабую корреляцию гидрофобности поверхности белка, измеренной с использованием связывания с *цис*-паринаровой кислотой, с эмульгирующими свойствами некоторых белков можно объяснить тем, что *цис*-паринаровая кислота не обладает молекулярной подвижностью. Для эмульгирующих свойств белков более важна подвижность молекул на границе раздела фаз.

Предшествующая эмульгированию частичная денатурация белков, которая не приводит к их нерастворимости, обычно улучшает эмульгирующие свойства. Это объясняется молекулярной подвижностью и гидрофобностью поверхности молекул. В развернутом состоянии белки со свободными сульфгидрильными группами и дисульфидными мостиками подвергаются медленной полимеризации посредством дисульфид-сульфгидрильных реакций [32], что приводит к образованию вязкоэластичной пленки на границе раздела фаз «масло–вода». Избыточная тепловая денатурация снижает эмульгирующие свойства, поскольку белки становятся нерастворимыми.

За адсорбцию на границе раздела фаз с белками конкурируют низкомолекулярные эмульгаторы, обычно присутствующие в пищевых продуктах (в частности фосфолипиды) [24, 38, 67]. Поскольку небольшие молекулы ПАВ на границе раздела фаз быстро диффундируют и у них нет конформационных препятствий для переориентации, они при высоком их содержании способны препятствовать адсорбции белков. Если добавить к стабилизированной белком эмульсии низкомолекулярные эмульгаторы, то они вымещают белок с границы раздела фаз и обусловливают нестабильность эмульсии.

Еще одним фактором, определяющим стабилизацию эмульсий белком, является состав белков. Яичный белок, например, — это смесь пяти основных и нескольких второстепенных компонентов, сывороточный белок — это смесь α-лактоальбумина и β-лактоглобулина, а также некоторых других минорных белков. Например, изолят соевого белка, содержит по крайней мере две основные белковые фракции — легумин и вицилин. При эмульгировании эти компоненты белковой смеси конкурируют друг с другом за

адсорбцию на границе раздела фаз. Состав белковой пленки на этой границе зависит от относительной поверхностной активности различных белков в смеси. Например, при смешивании α- и β-казеинов в равной пропорции и их адсорбции на границе раздела фаз «масло–вода» количество α-казеина в белковой пленке в равновесном состоянии почти в два раза больше, чем β-казеина [30], а на границе раздела фаз «воздух–вода» наблюдается противоположная ситуация [6]. Различия в составе белков в объемной фазе влияют на состав образующейся пленки и, возможно, на стабильность эмульсии.

При большой концентрации белков в растворе они проявляют несовместимость [100]. В смешанных белковых пленках на границе раздела фаз «масло–вода», где локальная концентрация белка составляет 15–30%, в ходе хранения происходит двухмерное фазовое разделение белков (см. работы [105, 114] для границы раздела фаз «воздух–вода» и [30] — для границы раздела фаз «масло–вода»). Если четкое фазовое разделение белков наблюдается в смешанной белковой пленке вокруг жировых капель, то очевидно, что границы таких отдельных фазовых областей могут быть причиной нестабильности эмульсии. Вместе с тем еще предстоит установить четкую корреляцию между термодинамической несовместимостью белковой смеси в смешанной пленке на границе раздела фаз «масло–вода» и кинетической стабильностью эмульсий, полученных с помощью белковых смесей.

5.5.3.2. Пенообразующие свойства

Пена состоит из двух фаз — дисперсионной водной и воздушной дисперсной. Многие переработанные пищевые продукты являются по сути пенами — это относится, например, ко взбитым сливкам, мороженому, меренгам, хлебобулочным изделиям, кексам, суфле, муссам и маршмеллоу. Уникальные текстура этих продуктов и ощущение от них во рту являются следствием наличия в них диспергированных мельчайших пузырьков воздуха. В большинстве этих продуктов основными поверхностно-активными веществами, способствующими образованию и стабильности дисперсной газовой фазы, являются белки.

Как правило, пены, стабилизированные белком, получают путем барботирования, взбивания или встряхивания раствора белка. Пенообразующие свойства белков обусловлены их способностью образовывать тонкую прочную пленку на границе раздела фаз «газ–жидкость», так что в продукт может быть включено и стабилизировано большое количество пузырьков воздуха. Пенообразующие свойства оценивают разными способами. Способность белков к пенообразованию зависит от площади образуемой ими поверхности раздела фаз, которую можно рассчитать несколькими способами — определением взбитости (объема стабилизированной пены) или показателя вспенивания. Взбитость рассчитывается как

$$\text{Взбитость} = \frac{\text{Объем пены}}{\text{Объем исходной жидкости}} \cdot 100. \tag{5.58}$$

Показатель всепенивания — это:

$$\text{Показатель вспенивания} = \frac{\text{Объем газообразной фазы}}{\text{Объем жидкой фазы}} \cdot 100. \tag{5.59}$$

Показатель вспенивания обычно возрастает до максимального значения по мере увеличения концентрации белка и зависит от технологии получения пены. При заданной концентрации белка показатель вспенивания зачастую используют как базу для сравнения пенообразующих свойств различных белков (его значения для различных белков при pH 8,0 приведены в табл. 5.15) [82].

Пеностойкостью называют способность белков стабилизировать пену относительно гравитационного и механического воздействия. Зачастую ее выражают как время, за которое пена теряет 50% жидкой фазы, или как время уменьшения объема пены на 50%. Этот метод очень эмпиричен и не дает нужной информации о факторах, влияющих на стойкость пены. Прямой метод измерения пеностойкости отражает уменьшение площади поверхности границы раздела фаз за определенное время. Согласно закону Лапласа, внутреннее давление пузырьков воздуха выше внешнего (атмосферного) давления, и при постоянных условиях разница давлений ΔP определяется формулой

$$\Delta P = p_i - p_o = \frac{4\gamma}{r}, \tag{5.60}$$

Таблица 5.15
Показатель вспенивания растворов различных белков. По [102]

Белок	Показатель вспенивания (по уравнению 5.59) при концентрации белка 0,5 %масс./%об.
Бычий сывороточный альбумин	280
Изолят сывороточного белка	600
Яичный альбумин	240
Овальбумин	40
Белок бычьей плазмы крови	260
β-Лактоглобулин	480
Фибриноген	360
Соевый белок, гидролизованный ферментами	500
Желатин (из свиной кожи кислотной обработки)	760

где p_i *и* p_0 — это соответственно внутреннее и внешнее давление; r —радиус пузырька пены; γ — поверхностное натяжение. Согласно этому уравнению давление внутри закрытого сосуда с пеной при разрушении пены будет увеличиваться. Результирующее изменение давления составит [92]

$$\Delta P = \frac{-2\gamma \Delta A}{3V}, \tag{5.61}$$

где V — общий объем системы; ΔP — изменение давления; ΔA — изменение площади поверхности раздела фаз из-за разрушения пены. Исходная площадь поверхности раздела фаз равна:

$$A_0 = \frac{3V\Delta P_\infty}{2\gamma}, \tag{5.62}$$

где ΔP_∞ — это общее изменение давления при полном разрушении пены. A_0 —это мера способности к пенообразованию. Скорость снижения A со временем можно использовать для оценки пеностойкости. Такой подход использовался для изучения пенообразующей способности пищевых белков [133, 135].

Понятия *прочность* и *жесткость* пены относятся к максимальному весу столба пены, при котором она не разрушается. Оценить их можно путем измерения вязкости пены.

5.5.3.2.1. Условия, влияющие на пенообразование и стойкость пены

Значение pH. В некоторых работах было показано, что пены, стабилизированные белками, более стабильны в изоэлектрической точке, чем при любом другом значении pH (при условии, что данный белок при pI растворим). При значениях pH, близких к pI, отсутствие сил отталкивания способствует взаимодействиям «белок–белок» и образованию на границе раздела фаз вязкой пленки. Кроме того при возрастании количества белка он адсорбируется при pI на границе раздела из-за более слабых сил отталкивания между границей раздела фаз и адсорбирующимися на ней молекулами. Эти два фактора способствуют и пенообразованию, и стойкости пены. Если белок при pI слабо растворим (что относится к большинству белков), то в пенообразовании будет участвовать только растворимая белковая фракция. Поскольку ее концентрация очень мала, количество образующейся пены будет мало, но она будет очень стойкой. Хотя нерастворимая фракция белков и не участвует в пенообразовании, адсорбция этих нерастворимых белковых частиц может стабилизировать пену (возможно, за счет увеличения когезионных сил в белковой пленке). Как правило, адсорбция гидрофобных частиц повышает стойкость пены. При значениях pH, отличных от pI, пенообразующая способность белков выше, а стойкость пены ниже. У яичного белка хорошие пенообразующие свойства наблюдаются при pH 8–9 и при его изоэлектрической точке 4–5.

Содержание солей. Влияние солей на пенообразующие свойства белков зависит от типа соли и растворимости белка в данном солевом растворе. Пенообразующие свойства и стойкость пены у большинства глобулярных белков (бычий сывороточный белок, яичный альбумин, глютен и соевые белки) с ростом концентрации NaCl повышаются, что обусловлено нейтрализацией зарядов ионами соли. Вместе с тем

Таблица 5.16
Влияние NaCl на пенообразующие свойства изолята сывороточного белка и стойкость пены. По [136]

Концентрация NaCl, М	Площадь поверхности границы раздела фаз, $см^2/см^3$ пены	Время сокращения исходной площади границы раздела фаз на 50%, с
0,00	333	510
0,02	317	324
0,04	308	288
0,06	307	180
0,08	305	165
0,10	287	120
0,15	281	120

для некоторых белков (в частности, сывороточных) характерен обратный эффект, а именно пенообразующие свойства и стойкость пены с увеличением концентрации NaCl снижаются (табл. 5.16) [136], что объясняется всаливанием сывороточных белков, особенно β-лактоглобулина. Белки, которые высаливаются в данном солевом растворе, характеризуются боле высокими пенообразующими свойствами, а те, которые всаливаются, — низкими. Двухвалентные катионы (Ca^{2+} и Mg^{2+}) при концентрации 0,02–0,4 М резко повышают пенообразование и стойкость пены, что обусловлено прежде всего перекрестной сшивкой белковых молекул и образованием пленок с более высокими вязкоэластичными свойствами [134].

Содержание сахаров. Добавление в белковые растворы сахарозы, лактозы и других сахаров зачастую ухудшает пенообразование, но повышает стойкость пены. Положительное влияние сахаров объясняется увеличением вязкости объемной фазы, что снижает темпы потерь жидкости ламеллами. Снижение взбитости обусловлено прежде всего более стабильной структурой белка в сахарных растворах, из-за чего молекулы белка хуже раскручиваются при адсорбции на границе раздела фаз. Это уменьшает способность белков снижать силы поверхностного натяжения на границе раздела фаз, увеличивать площадь поверхности этой границы и давать большой объем пены при взбивании. В пенообразные сахарные кондитерские изделия (меренги, суфле, зефир и т. п.) сахар предпочтительнее вносить по возможности после взбивания — это позволит молекулам белка адсорбироваться на границе раздела фаз, раскручиваться и образовать стабильную пленку, а внесение сахара повысит стойкость пены благодаря увеличению вязкости жидкости в ламеллах.

Содержание жиров. Жиры, особенно фосфолипиды, в концентрации более 0,5% значительно ухудшают пенообразующие свойства белков. Поскольку липиды более поверхностно-активны, чем белки, они быстро адсорбируются на границе раздела фаз «воздух–вода» и препятствуют адсорбции белков при пенообразовании. Поскольку у липидных пленок хуже когезионные и вязкоэластичные свойства, необходимые для противодействия внутреннему давлению пузырьков пены, эти пузырьки при взбивании быстро расширяются и лопаются. Таким образом, обезжиренные сывороточные концентраты и изоляты, соевые белки и яичный белок (без присутствия желтка) характеризуются более высокими пенообразующими свойствами, чем белковые препараты с примесями жиров.

Концентрация белка. Некоторые свойства пен зависят от концентрации белка — чем выше его концентрация, тем жестче пена. Жесткость пены обусловлена малыми размерами пузырьков и высокой вязкостью. Стойкость пены при повышении концентрации белка увеличивается из-за повышения вязкости и облегчения формирования многослойной когезионной белковой пленки на границе раздела фаз. Пенообразующие свойства белков максимальны при определенной их концентрации. Некоторые белки, в частности сывороточный альбумин, могут образовывать относительно стойкую пену при концентрации белка 1%, тогда как изоляты соевого белка и соевые белки — при концентрации не менее 2–5%. Как правило, максимальная пенообразующая способность большинства белков наблюдается при концентрации 2–8%. Концентрация белка в пене на границе раздела фаз составляет около 2–3 $мг/м^2$.

Частичная термическая денатурация способствует улучшению пенообразующих свойств белков. Так, нагревание изолятов сывороточных белов до 70 °С в течение 1 мин улучшает, а нагревание до 90 °С

в течение 5 мин ухудшает их пенообразующие свойства, несмотря на то что нагретый белок в обоих случаях остается растворимым [135]. В последнем случае происходит обширная полимеризация белка путем дисульфидно-сульфгидрильных реакций обмена. При пенообразовании сильно полимеризованные и сшитые белки не способны адсорбироваться к поверхности границы раздела фаз «воздух–вода».

На пенообразующие свойства белков влияет также метод образования пены. Аэрирование путем барботажа обычно дает «мокрую» пену с относительно крупными пузырьками воздуха, тогда как взбивание при средней скорости дает пену с мелкими пузырьками благодаря сдвигу, приводящему к частичной денатурации белка перед адсорбцией. Вместе с тем взбивание при высокой скорости сдвига или «перевзбитость» снижает пенообразующую способность белков из-за их денатурации, агрегации и осаждения.

Некоторые пенообразные пищевые продукты (маршмеллоу, кексы и хлебобулочные изделия) после образования пены проходят тепловую обработку. При нагревании из-за расширения воздуха и снижения вязкости может происходить разрыв пузырьков воздуха и разрушение пены. В этом случае целостность пены зависит от степени гелеобразования белковой пленки на границе раздела фаз, обусловливающей достаточную для стабилизации пены механическую прочность пленки. В этих целях широко применяются желатин, глютен и яичный белок, обладающие хорошими пено- и гелеобразующими свойствами.

5.5.3.2.2. Молекулярные свойства, влияющие на пенообразование и стойкость пены

Чтобы белки обладали хорошими пенообразующими и эмульгирующими свойствами, необходимы следующие условия:

- они должны быстро адсорбироваться к границе раздела фаз «воздух–вода»;
- они должны легко раскручиваться и перераспределяться на границе раздела фаз;
- путем межмолекулярных взаимодействий они должны образовывать вязкие когезионные пленки.

К молекулярным свойствам белков, влияющим на пенообразование, относятся молекулярная гибкость, плотность и распределение заряда и гидрофобность.

Свободная энергия на границе раздела фаз «воздух–вода» гораздо больше, чем на границе «масло–вода». Это означает, что для стабилизации границы «воздух–вода» белки должны быть способны быстро адсорбироваться к вновь образованной границе и мгновенно снижать поверхностное натяжение до минимального. Снижение сил поверхностного натяжения на границе раздела фаз зависит от способности белков легко раскручиваться и перераспределяться с перемещением гидрофобных групп к границе раздела фаз. Такой способностью обладают белки с неупорядочненой спиральной структурой (например, β-казеин). Плотно скрученные молекулы глобулярных белков (например, лизоцима) адсорбируются очень медленно, раскручиваются лишь частично и слабо снижают поверхностное натяжение на границе раздела фаз [130], то есть лизоцим, следовательно, обладает слабыми пенообразующими свойствами. Таким образом, молекулярная гибкость — это существенный фактор для пенообразующих свойств белков.

Помимо молекулярной гибкости важную роль играет гидрофобность. Показатель вспенивания белков положительно коррелирует со *средней* гидрофобностью, однако при изменении *поверхностной* гидрофобности она изменяется криволинейно, и большой корреляции этих двух свойств при значениях гидрофобности выше 1000 не наблюдается [63]. Это свидетельствует о том, что для начала адсорбции белков к границе раздела фаз «воздух–вода» поверхностная гидрофобность должна составлять не менее 1000, но после адсорбции способность белков увеличить площадь поверхности границы раздела фаз при пенообразовании зависит от средней гидрофобности данного белка.

Белки с высокой способностью к пенообразованию совсем не обязательно являются хорошими стабилизаторами пены. Так, β-казеин обладает очень высокими пенобразующими свойствами, но стойкость его пены довольно мала, тогда как лизоцим — плохой пенообразователь, но дает очень стойкую пену. Как правило, белки с высокими пенообразующими свойствами не обладают свойствами стабилизаторов пены и наоборот. На пенообразование и стойкость пены влияют два разных молекулярных свойства белков, которые зачастую антагонистичны. Если пенообразующие свойства обусловлены скоростью адсорбции, гибкостью и гидрофобностью молекулы белка, то стойкость пены зависит от степени гидратации, плотности, концентрации и преимущественных молекулярных взаимодействий. Частично раскрученные молекулы белков, содержащие свернутые фрагменты (например, лизоцим и сывороточный альбумин), обычно

образуют плотную толстую пленку и дают более стойкую пену в отличие от молекул белков, полностью раскрученных на границе раздела фаз «воздух–вода» (например, β-казеин). В первом случае скрученная структура располагается под поверхностью раздела фаз в форме петель, и нековалентные взаимодействия (и возможно дисульфидные мостики) между этими петлями способствуют образованию гелеподобной структуры с хорошими вязкоэластичными и механическими свойствами. Чтобы белок обладал и хорошими пенообразующими свойствми, и давал стойкую пену, между гибкостью и жесткостью его молекул должен существовать соответствующий баланс, они должны легко раскручиваться на границе раздела фаз и вступать в дополнительные когезионные взаимодействия. Вместе с тем предсказать, какая именно «степень раскрученности» необходима, довольно трудно, если не невозможно. Кроме того, стойкость пены обратно попорциональна плотности заряда белка. Чем выше плотность заряда, тем вероятнее образование когезионной пленки.

Большинство пищевых белков представляют собой смесь различных белков, и, следовательно, их пенообразующие свойства зависят от взаимодействий белковых компонентов на границе раздела фаз. Прекрасная взбиваемость яичного белка обусловлена взаимодействиями между такими его компонентами, как овальбумин, кональбумин и лизоцим. В некоторых работах показано, что пенообразующие свойства кислотных белков можно улучшить путем их смешивания их со щелочными белками типа лизоцима и клупеина [102]. Этот эффект связан с образованием между кислотными и щелочными белками электростатического комплекса.

Ограниченный ферментный гидролиз белков улучшает их пенообразующие свойства благодаря увеличению молекулярной гибкости и перемещению гидрофобных групп к границе раздела фаз. Вместе с тем обширный гидролиз ухудшает пенообразующие свойства белков из-за неспособности низкомолекулярных пептидов образовывать на границе раздела фаз когезионные пленки.

5.5.4. Связывание вкусоароматических веществ

Сами по себе белки запахом не обладают, однако они могут связывать ароматические вещества, влияя таким образом на органолептические свойства продуктов. Некоторые белки, особенно из семян масличных культур и концентраты сывороточного белка, имеют нежелательный привкус и запах, что ограничивает их применимость в производстве пищевых продуктов. Этот побочный вкус и запах обусловлен в основном альдегидами, кетонами и спиртами, образующимися при окислении ненасыщенных жирных кислот. После образования этих карбонильных соединений они связываются с белками и придают им специфические привкусы и запахи. Например, травянистый и бобовый привкус соевого белка обусловлен присутствием гексаналя. Сродство к связыванию у некоторых карбонильных соединений настолько велика, что они не поддаются даже экстракции растворителем. Для разработки соответствующего способа удаления этих соединений необходимо понимать механизм их связывания с белками.

Связывание белками вкусоароматических соединений имеет и положительные стороны, поскольку белки можно использовать в качестве носителей вкусоароматических веществ или модификаторов вкуса. Это особенно полезно для заменителей мяса на основе растительных белков, где для потребителя важна успешность имитации мясного вкуса. Чтобы белки были хорошими носителями вкусоароматических веществ, они должны обладать хорошим связывающими свойствами, удерживать эти вещества в ходе переработки и высвобождать их при пережевывании. Вместе с тем белки обладают разным сродством к связыванию вкусоароматических веществ, что приводит к разному удерживанию отдельных вкусоароматических соединений и их потерям при переработке. Поскольку связанные с белками вкусоароматические вещества проявляют свои вкусоароматические свойства только при их высвобождении в ротовой полости, знание механизма взаимодействия и сродства с белками важно как для производства продуктов со вкусоароматическими белками, так и для удаления из белковых изолятов нежелательных привкусов и запахов.

5.5.4.1. Термодинамика взаимодействий белков со вкусоароматическими соединениями

В модельных системах «вода–вкусоароматическое соединение» добавление белков вызывает снижение концентрации вкусоароматических соединений в свободном газовом пространстве над продуктом, что

объясняется связыванием их с белками. Механизм связывания зависит от содержания влаги в белковом образце, но обычно эти взаимодействия нековалентны. Сухой белковый препарат связывает вкусоароматические соединения посредством Ван-дер-Ваальсовых сил, водородного связывания и электростатических взаимодействий. На вкус и запах сухого белкового препарата может влиять также физическое проникновение вкусоароматического соединения в капилляры и поры препарата. В жидких пищевых продуктах и в продуктах с высоким содержанием влаги механизм связывания белками вкусоароматических соединений обусловлен взаимодействием неполярных участков (лигандов) последних с гидрофобными порами или участками поверхности белка. Помимо гидрофобных взаимодействий вкусоароматические соединения с полярными группами в «голове» (гидроксильными и карбоксильными) могут взаимодействовать с белками и посредством водородного связывания и сил электростатического взаимодействия. После связывания с гидрофобными участками поверхности белка альдегиды и кетоны могут диффундировать в гидрофобную внутреннюю область белковой молекулы.

Взаимодействие «белок–вкусоароматическое соединение» обычно полностью обратимо, однако альдегиды могут ковалентно связываться с аминогруппой боковой цепи лизина, и такое взаимодействие уже не обратимо. Придавать вкус и аромат белковым продуктам могут только нековалентно связанные фракции.

Степень связывания вкусоароматических соединений гидратированными белками зависит от количества доступных на поверхности молекулы белка гидрофобных областей [28]. Эти места связывания обычно состоят из групп гидрофобных остатков, собранных воедино в явной полости. Одиночные неполярные остатки могут быть местами связывания с гораздо меньшей вероятностью. В равновесном состоянии такое обратимое нековалентное связывание вкусоароматических соединений с белками подчиняются уравнению Скатчарда (*Scatchard*):

$$\frac{\upsilon}{[L]} = nK - \upsilon K, \tag{5.63}$$

где υ это количество молей лиганда, связанного с 1 М белка; n — общее число мест связывания на 1 М белка; $[L]$ — концентрация свободных лигандов в состоянии равновесия; K — это равновесная константа связывания, M^{-1}.

Согласно этому уравнению, график зависимости $\upsilon/[L]$ от υ будет представлять собой прямую; значения K и n получают соответственно по углу наклона и точке пересечения. Изменение свободной энергии связывания «лиганд–белок» получают из уравнения:

$$\Delta G = -RT \ln K,$$

где R — газовая постоянная; а T — абсолютная температура.

Термодинамические константы связывания карбонильных соединений с различными белками представлены в табл. 5.17 [28, 29, 95]. Эти константы связывания при увеличении длины цепи на одну метиленовую группу возрастают втрое с соответствующим изменением свободной энергии в –0,55 ккал/моль на одну CH_2-группу, то есть связывание имеет гидрофобную природу.

В уравнении Скатчарда предполагается, что все места связывания белков с лигандами обладают одинаковым сродством и что конформационных изменений при связывании лигандов не происходит. Вместе с тем при связывании вкусоароматических соединений белки обычно претерпевают некоторые конформационные изменения. Диффузия вкусоароматических соединений внутрь молекулы белка может нарушить гидрофобные взаимодействия между сегментами белка и дестабилизировать его структуру. Вкусоароматические лиганды, имеющие в своем составе реакционноспособные группы (например, альдегидные), могут ковалентно связываться с ε-аминогруппами лизиновых остатков, изменять общий заряд белка и вызывать тем самым раскручивание его молекулы, что, в свою очередь, обеспечивает появление новых гидрофобных участков для связывания лигандов. Из-за этих структурных изменений график зависимости Скатчарда обычно имеет вид кривой. У олигомерных белков типа соевых конформационные изменения могут приводить к диссоциации и раскручиванию подъединиц. Денатурированные белки обычно обеспечивают больше мест связывания, характеризующихся небольшими константами ассоциации. Методы измерения связывания белков со вкусоароматическими соединения описаны в работах [28, 29].

Таблица 5.17
Термодинамические константы связывания карбонильных соединений с белками. По [28, 29, 95]

Белок	Карбонильное соединение	n, М/М	K, $М^{-1}$	ΔG (ккал/моль)
Сывороточный альбумин	2-нонанон	6	1800	−4,4
	2-гептанон	6	270	−3,3
β-лактоглобулин	2-гептанон	2	150	−3,0
	2-октанон	2	480	−3,7
	2-нонанон	2	2440	−4,7
Соевый белок:				
нативный	2-гептанон	4	110	−2,8
	2-октанон	4	310	−3,4
	2-нонанон	4	930	−4,1
	5-нонанон	4	541	−3,8
	нонаналь	4	1094	−4,2
частично денатурированный	2-нонанон	4	1240	−4,3
сукцинированный	2-нонанон	2	850	−4,0

Примечание. *n* — количество мест связывания в нативном состоянии; *K* — равновесная константа связывания.

5.5.4.2. Факторы, влияющие на связывание вкусоароматических соединений

Поскольку летучие вкусоароматические соединения взаимодействуют с гидратированными белками в основном путем гидрофобных взаимодействий, то любые факторы, влияющие на эти взаимодействия, или степень гидрофобности поверхности молекулы белков изменяют связывание вкусоароматических соединений. Температура на связывание влияет очень слабо до тех пор, пока не происходит значительное раскручивание молекулы белка. Это связано с тем, что процесс ассоциации обусловлен прежде всего энтропией, а не энтальпией. Повышенную способность связывать вкусоароматические соединения проявляют термически денатурированные белки, однако их константа связывания обычно меньше, чем у нативных белков. Влияние солей на связываниея вкусоароматических соединений обусловлено эффектами всаливания и высаливания. Всаливающие соли, дестабилизирующие гидрофобные взаимодействия, уменьшают связывание вкусоароматических соединений, тогда как высаливающие соли увеличивают их связывание.

Влияние pH связано с конформационными изменениями, происходящими в белках под действием pH. Обычно связывание в щелочной среде усиливается по сравнению с кислой, так как в щелочной среде белки сильнее денатурируются. Разрушение дисульфидных мостиков в щелочном диапазоне pH, приводящее к раскручиванию молекулы белка, приводит к усилению связывания. Протеолиз ведет к снижению в молекуле белка количества гидрофобных областей и, соответственно, к уменьшению связывания вкусоароматических соединений, что может использоваться для удаления побочных привкусов и запахов из белков семян масличных растений

5.5.5. Вязкость

Приемлемость для потребителя некоторых жидких продуктов и продуктов эмульсионной природы (подлив, соусов, супов, напитков и т. п.) зависит от их вязкости и консистенции. Вязкость раствора определяется его сопротивлением течению при данном усилии сдвига. Для идеального раствора усилие сдвига (то есть сила на единицу площади, F/A) прямо пропорционально скорости сдвига (градиенту скорости между слоями жидкости, dv/dr):

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dr}. \tag{5.64}$$

Константа пропорциональности η — это коэффициент вязкости, а жидкости, подчиняющиеся этому уравнению, называют ньютоновскими.

Течение растворов во многом определяется типом растворенного вещества. Высокомолекулярные растворимые полимеры намного увеличивают вязкость даже в небольших концентрациях. Она зависит также от таких молекулярных свойств, как размер, форма, гибкость и гидратация молекул. Растворы с неупорядоченными скрученными макромолекулами более вязкие, чем растворы с компактно упакованными макромолекулами той же молекулярной массы.

Большинство макромолекулярных растворов, включая белковые, не являются ньютоновскими жидкостями, особенно при высоких концентрациях белка. Для таких систем коэффициент вязкости при возрастании скорости сдвига уменьшается. Такое поведение называют *псевдопластичным,* и оно подчиняется уравнению

$$\frac{F}{A} = m\left(\frac{dv}{dr}\right)^n \qquad (5.65)$$

где m— коэффициент консистенции; n — показатель степени, известный как «индекс текучести».

Псевдопластичное поведение белковых растворов обусловлено склонностью белковых молекул ориентироваться относительно основной оси направления течения, а также диссоциацией слабо связанных димеров и олигомеров до мономеров. При прекращении сдвига или течения вязкость может как вернуться, так и не вернуться к первоначальному значению в зависимости от скорости возврата белковых молекул к случайной ориентации. Растворы тканевых белков (например, желатина и актомиозина) обычно остаются ориентированными, и поэтому они медленно возвращаются к первоначальной вязкости, тогда как растворы глобулярных белков (соевых или сывороточных) при остановке течения быстро возвращаются к исходной вязкости. Такие растворы названы *тиксотропными.*

Коэффициент вязкости (консистенции) большинства белковых растворов связан с концентрацией белка экспоненциальной зависимостью, что обусловлено взаимодействиями «белок–белок» и взаимодействиями между гидратированными сферическими областями белковых молекул. Пример раствора с фракциями соевого белка приведен на рис. 5.28 [104]. При высокой концентрации или в белковом геле, где существенны взаимодействия «белок–белок», белкам свойственно вязкоупругое поведение. В этом случае для инициации течения необходимо приложить определенную силу, соответствующую пределу текучести.

Вязкость белков является проявлением комплексного взаимодействия нескольких переменных — размера и формы молекул белка, взаимодействий «белок–растворитель», гидродинамического объема и гибкости молекул в гидратированном состоянии. При растворении в воде белки поглощают воду и набухают. Объем гидратированной молекулы намного больше, чем не гидратированной. Ассоциированная с белком вода имеет долгосрочный эффект на реологические свойства растворителя. Зависимость вязкости от формы и размера молекулы белка определяется соотношением

$$\eta_{sp} = \beta C\left(\bar{\upsilon}_2 + \delta_1\bar{\upsilon}_1\right)^n \qquad (5.66)$$

где η_{sp} — удельная вязкость; β — показатель формы; C — концентрация; $\bar{\upsilon}_2$ и $\bar{\upsilon}_1$ — удельные объемы соответственно негидратированного белка и растворителя; Δ_1 — это масса связанной воды в граммах на 1 г белка. Здесь $\bar{\upsilon}_2$ относится также к гибкости молекулы — чем больше удельный объем данного белка, тем больше его гибкость.

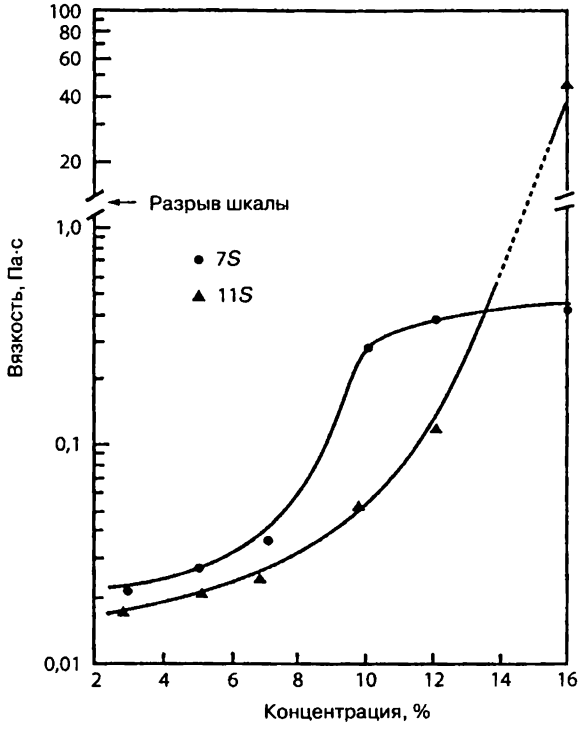


Рис. 5.28. Зависимость вязкости от концентрации белка (показатель консистенции) для раствора 7*S*- и 11*S*-фракций соевого белка при 20 °С. По [104]

Вязкость разбавленных белковых растворов белков выражают несколькими способами. *Относительная вязкость* η_{rel} — это отношение вязкости белкового раствора к вязкости растворителя и измеряется с помощью капиллярных вискозиметров Оствальда-Фенске. Она определяется как:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0}, \tag{5.67}$$

где ρ и ρ_0 — это плотности соответственно белкового раствора и растворителя; t и t_0 — время течения данных объемов белкового раствора и растворителя через конкретный капилляр.

Другие формы выражения вязкости можно получить по относительной вязкости. *Удельная вязкость* определяется как

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1. \tag{5-68}$$

Приведенная вязкость равна

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}, \tag{5.69}$$

где C — это концентрация белка; *собственная вязкость* — это

$$[\eta] = \mathrm{Lim}\frac{\eta_{sp}}{C}. \tag{5.70}$$

Собственную вязкость $[\eta]$ получают путем экстраполяции зависимости приведенной вязкости от концентрации белка относительно его нулевой концентрации (Lim). Поскольку взаимодействия «белок–белок» при бесконечном разбавлении несущественны, собственная вязкость с достаточной точностью отражает влияние формы и размера молекул белка на реологические свойства отдельных белковых молекул. Изменения гидродинамической формы белков под действием нагревания и значения pH можно получить путем измерения их собственной вязкости.

5.5.6. Гелеобразование

Гель — это промежуточная фаза между твердым и жидким состоянием, определяемая как «значительно разбавленная система с отстутствием признаков стабильного течения» [43]. Гель образуется из поперечно сшитых ковалентными или нековалентными связями полимеров, образующих сетевую структуру, которая способна удерживать воду и другие низкомолекулярные вещества (см. главу 13).

Гелеобразование белков относится к переходу от золя к гелеподобному состоянию, который при определенных условиях облегчается нагреванием, действием ферментов или двухвалентными катионами. К образованию сетевой структуры приводят все эти факторы, однако у них различные механизмы образования сети и типы ковалентных или нековалентных взаимодействий.

Большинство пищевых белковых гелей получают нагреванием растворов белков средней концентрации. При таком типе гелеобразования белок из состояния золя сначала денатурируется до состояния «предгеля» (иногда его называют «прогелем»). Для золя характерно наличие ограниченного числа нековалентно связанных групп, доступных для образования сетевой структуры, тогда как «предгель» обычно представляет собой вязкую жидкость из уже до некоторой степени денатурировавшего и полимеризованного белка. В этом состоянии (в предгеле) некоторое критическое число функциональных групп с водородными связями и гидрофобных групп, способных образовывать межмолекулярные нековалентные связи, настолько «выступают» из молекулы, что может начаться второй этап, а именно образование сетевой белковой структуры. Преобразование золя в прогель необратимо, поскольку между «раскрученными» молекулами белка происходят многочисленные межмолекулярные взаимодействия. При охлаждении предгеля до комнатной температуры или температуры холодильного хранения уменьшение термической кинетической энергии облегчает образование стабильных нековалентных связей между «выступающими наружу» функциональными группами различных молекул, что и подразумевает гелеобразование.

В процессе гелеобразования участвуют главным образом водородные связи, а также гидрофобные и электростатические взаимодействия. Относительная роль этих сил зависит от типа белка, степени денатурации, условий нагревания и окружающей среды. Водородное связывание и гидрофобные взаимодействия

обусловливают больший вклад в образование сетевой структуры, чем электростатические взаимодействия (за исключением случаев участия в поперечной сшивке мультивалентных ионов). Поскольку у белков обычно имеется собственный заряд, между молекулами белков наблюдается электростатическое отталкивание, что, как правило, неблагоприятно сказывается на образовании сетевой структуры, но эти заряженные группы необходимы для взаимодействий «белок–вода» и влагоудерживающей способности геля.

Сетевая структура геля, обеспечиваемая прежде всего нековалентными взаимодействиями, термически обратима, то есть при повторном нагревании она превращается обратно в предгель, что и наблюдается в общеизвестном примере желатина. Особенно это проявляется в том случае, если основную роль в структуре геля играют водородные связи. Поскольку гидрофобные взаимодействия при повышенных температурах сильны, сетевые гелевые структуры, изначально образованные в основном гидрофобными взаимодействиями, термически необратимы (пример — гели из яичного белка). Белки с цистеиновыми и цистиновыми группами при нагревании могут подвергаться полимеризации путем сульфидрильно-дисульфидных реакций, образуя при последующем охлаждении непрерывную ковалентную сеть. Такие гели обычно термически необратимы (примеры — овальбумин, β-лактоглобулин и гели из сывороточных белков).

Белки образуют два типа гелей — коагулятные (непрозрачные) и полупрозрачные гели. Тип образующегося белкового геля зависит от молекулярных свойств и условий раствора. Белки с большим количеством неполярных аминокислотных остатков подвергаются при денатурации гидрофобной агрегации:



(5.71)

где P_N — нативное состояние молекулы; P_D — ее раскрученное состояние; n — количество белковых молекул, участвующее в перекрестной сшивке.

Такие нерастворимые агрегаты затем случайным образом ассоциируют и образуют необратимый гель коагулянтного типа. Поскольку скорость агрегации и образования сетевой структуры выше, чем скорость денатурации, то белки данного типа легко образуют гелевые структуры даже при нагревании. Непрозрачность таких гелей обусловлена светорассеянием в неупорядоченной (изотропной) сети из нерастворимых белковых агрегатов. Гели коагулянтного типа обычно непрочные и подвержены синерезису.

Белки с небольшим количеством неполярных аминокислотных остатков образуют при денатурации растворимые комплексы. Поскольку скорость ассоциации этих комплексов ниже, чем скорость денатурации, а гелевая структура образована преимущественно водородными связями, она зачастую не переходит в гель без нагревания с последующим охлаждением (при этом обычно используют 8–12%-ные белковые растворы). При охлаждении небольшая скорость ассоциации этих растворимых комплексов облегчает образование прозрачной упорядоченной гелевой сети.

На молекулярном уровне у гелей коагулятного типа способность к геолеобразованию проявляется при суммарной концентрация *Val, Pro, Leu, Ile, Phe* и *Trp*-остатков более 31,5 мол% [116]. При меньшем содержании этих гидрофобных остатков и при использовании в качестве растворителя воды обычно образуется прозрачный гель. Вместе с тем при использовании в качестве растворителя солевого раствора это не так. Например, при содержании гидрофобного β-лактоглобулина 32 мол% он образует с водой прозрачный гель, но при использовании раствора поваренной соли (NaCl) концентрацией всего 50 мМ образуется гель коагулятного типа. Это происходит из-за нейтрализации заряда солью, что способствует гидрофобной ассоциации при нагревании. Таким образом, можно сказать, что от баланса между силами притяжения гидрофобных взаимодействий и электростатическими силами отталкивания зависит механизм гелеобра-

зования и внешний вид геля. Эти две силы контролируют также равновесие между взаимодействиями «белок–белок» и «белок–растворитель». Если первые намного сильнее вторых, то может образоваться осадок, а при преобладании вторых гелеобразования вообще может не произойти. Образование геля коагулянтного типа или прозрачного геля зависит от того, какова величина сил гидрофобного и гидрофильного взаимодействия между этими двумя крайними значениями.

Белковые гели представляют собой сильно гидратированные системы с содержанием иногда до 98% воды. Вода в структуре геля обладает химическим потенциалом (активностью), сходным с разбавленным водным раствором, но она утрачивает текучесть и с большим трудом может быть извлечена. Механизм, с помощью которой жидкая вода удерживается в гелях в связанном «полужидком» состоянии, до конца не ясен. Вместе с тем, из того, что прозрачные гели, образованные преимущественно водородными связями, удерживают больше воды, чем гели коагулятного типа, и меньше склонны к синерезису, можно предположить, что большая часть воды связана водородными связями с C=O- и N—H-связями пептидных групп и ассоциирована с заряженными группами в форме своего рода «гидратационной оболочки» и/или существует в виде обширных водородно-связанных сетей («вода–вода»), подобных льду. Возможно также, что внутри пространственно ограниченной области гелевой микроструктуры вода может служить средством перекрестной водородной сшивки между C=O- и N—H-группами пептидных сегментов (см. главу 2). Это может ограничивать текучесть воды внутри каждой ячейки сети, причем тем больше, чем меньше размеры данной ячейки. Вполне вероятно, что некоторая часть воды (так называемая «капиллярная») может удерживаться в порах гелевой структуры, особенно в гелях коагулянтного типа.

Стойкость сетевой гелевой структуры к термическим и механическим воздействиям зависит от количества и типов образованных перекрестных сшивок, приходящихся на один мономер цепи. Термодинамически структура геля будет стабильна только при том условии, что суммарная энергия взаимодействий мономеров в геле больше, чем их его общая кинетическая тепловая энергия. Это зависит как от внутренних (форма и размер молекул, общий заряд и т. д.), так и внешних факторов (значение pH, температура, ионная сила и т. д.). Зависимость корня квадратного прочности белкового геля от молекулярной массы линена [125]. Глобулярные белки с молекулярной массой менее 23 000 Да не могут образовывать при нагревании гели при любых концентрациях белка, за исключением того случая, когда у них имеется хотя бы одна свободная сульфгидрильная группа или дисульфидная связь. Эти сульфгидрильные группы облегчают полимеризацию, и в результате эффективная молекулярная масса полипептидов возрастает до значений, превышающих 23 000 Да. Желатиновые препараты с эффективной молекулярной массой менее 20 000 Да гелей не образуют.

Еще одним важным фактором является концентрация белка. Для образования стабильной гелевой структуры без нагревания требуется некоторая минимальная концентрация белка (*LCE, Least concentration endpoint*) [50]. Для соевых белков *LCE* составляет 8%, для яичного альбумина —3%, а для желатина — 0,6%. При концентрациях выше этой минимальной соотношение между прочностью геля G и концентрацией белка C обычно подчиняется степенной зависимости

$$G \propto (C - C_0)^n, \tag{5.72}$$

где C_0 — это *LCE*; для белков значение n составляет от 1 до 2.

На гелеобразование белков влияют также некоторые факторы окружающей среды, а именно значение pH, и присутствие солей и иных добавок. Вблизи изоэлектрической точки белки обычно образуют гели коагулятного типа. При крайних значениях pH из-за сильных сил электростатического отталкивания образуются слабые гели. Оптимальное значение pH для гелеобразования составляет для большинства белков около 7–8.

Белковое гелеобразование иногда облегчается ограниченным протеолизом, примером чего может служить сыр. Добавление к казеиновым мицеллам молока химозина (реннина) приводит к образованию геля коагулятного типа из-за расщепления входящего в состав мицелл к-казеина, что приводит к высвобождению гидрофильной гликомакропептидной части. У оставшихся так называемых *пара*-казеиновых мицелл поверхность очень гидрофобна и облегчает образование слабой гелевой сети.

К образованию геля приводит также ферментативная перекрестная сшивка белков при комнатной температуре. Для получения таких гелей зачастую применяют фермент трансглютаминазу, который катали-

зирует образование ε-(γ-глютамил)лизильной перекрестной сшивки между глютамином и лизильными группами молекул белка [91]. При использовании ферментативной перекрестной сшивки получают высокоэлестичные необратимые гели даже при низкой концентрации белка.

Для образования белковых гелей используют также двухвалентные катионы (например, Ca^{2+} и Mg^{2+}). Эти ионы образуют перекрестную сшивку отрицательно заряженных групп белковых молекул (пример гелей такого типа — тофу из соевого белка). Таким способом получают также альгинатные гели. Типовая технологическая схема получения тофу приведена на рис. 5.29.

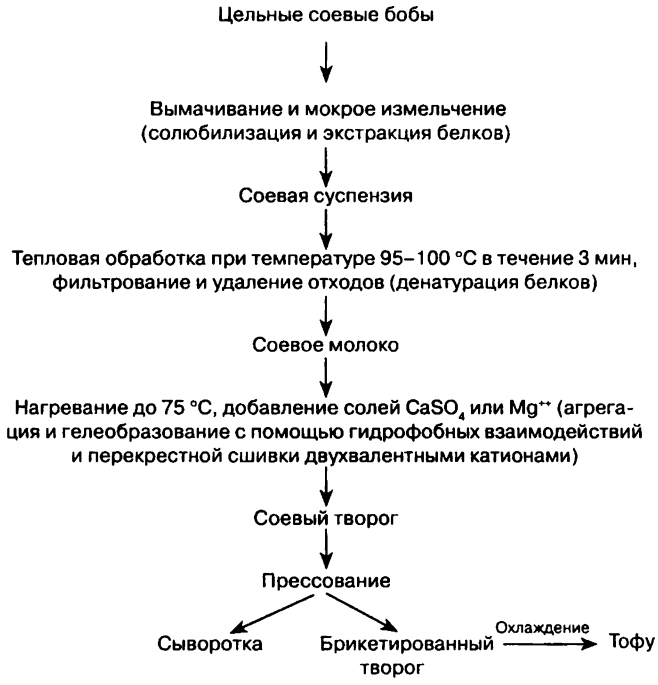


Рис 5.29. Типовая технологическая схема получения тофу

5.5.7. Текстуризация

Текстуризация подразумевает переход белков от глобулярного состояния в волокнистую структуру, дающую во рту ощущение волокон мяса. Текстурированные белковые продукты должны обладать различными функциональными свойствами, в том числе эластичностью, мягкостью, сочностью и пережевываемостью. В качестве источника белка для текстуризации зачастую используют растительные белки. Текстурированные растительные белки получают двумя разными способами — фильерным (*spun-fiber texturization*) и экструзией.

5.5.7.1. Фильерная текстуризация

По этой технологии сильно концентрированный ((около 20 %масс./об.) раствор изолята соевого белка доводят до значения pH 12–13 и выдерживают до тех пор, пока его вязкость не увеличится до 50 000–100 000 сПз в результате денатурации белка и перекрестной сшивки под действием щелочи. Эту очень вязкую пасту затем прокачивают через фильерный аппарат, пластина которой содержит тысячи микронных отверстий. Полученный волокнистый экструдат пропускают затем через ванну с фосфорной кислотой и солью (значение pH 2,5). В этой ванне белок мгновенно коагулирует и превращается в волокнистую массу, которую протягивают через стальные валки, где она уплотняется и растягивается, благодая чему повышается прочность. Волокно затем пропускают через промывочную ванну, где удаляется избыток кислоты и соли. После этого промытое волокно пропускают через последовательность резервуаров с жирами, вкусоароматическими веществами, пищевыми красителями и связующим (в зависимости от цели использования продукта). Затем его нагревают до 80–90 °C в целях инициирования гелеобразования белков связующего (в качестве связующего зачастую используют яичный белок, поскольку он отлично коагулируется при нагревании). Готовый продукт сушат и делят на порции. Технологическая схема фильерной текстуризации представлена на рис. 5.30.

5.5.7.2. Текстуризация экструзией

При текстуризации экструзией обезжиренная соевая мука или концентрат соевого белка с высоким индексом растворимости белка (*PSI*) обрабатывают паром так, чтобы содержание влаги составило 20–25%. Затем твердую массу подают в экструдер, представляющий собой вращающийся шнек в цилиндрическом корпусе, в котором зазор между шнеком и корпусом вдоль оси шнека постепенно сужается. По мере прохождения белковой массы белка через шнек она быстро нагревается до 150–180 °C. Такая высокая тем-

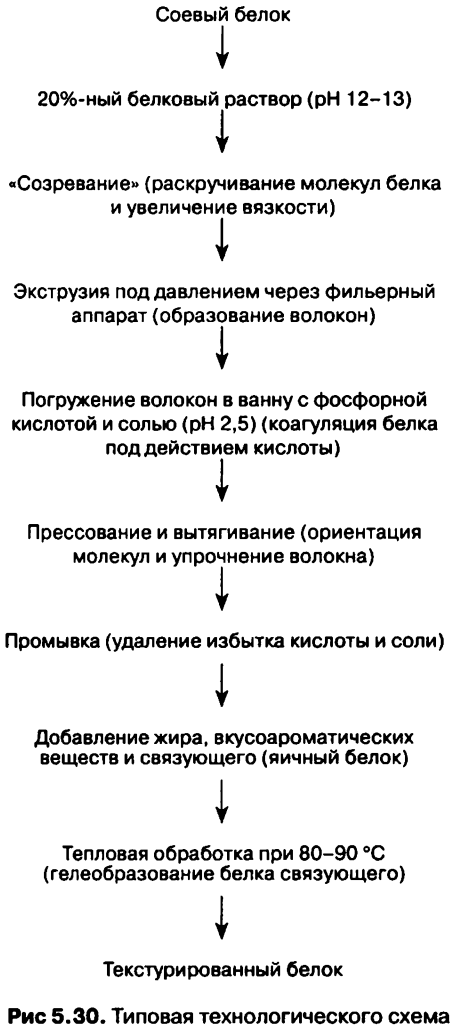


Рис 5.30. Типовая технологического схема фильерной текстуризации соевых белков

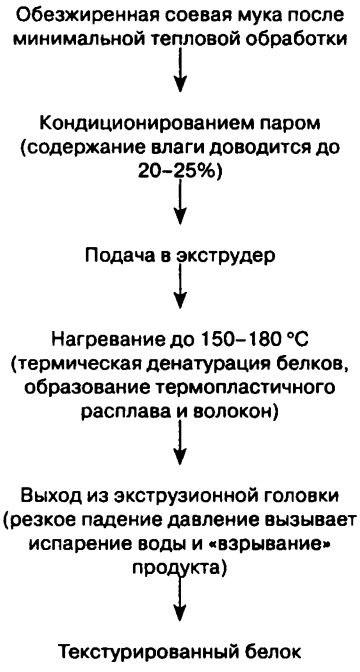


Рис. 5.31. Текстуризация соевой муки экструзией

пература и увеличение давления по мере прохождения массы напоминает процесс приготовления пищи в скороварке, и в результате белковая масса расплавляется, а белок денатурируется. С технической точки зрения этот процесс является термопластичным плавлением. Денатурированные белки по мере прохождения массы через шнек приобретают форму волокон. При выходе массы из экструзионной головки давление быстро падает и вода испаряется, в результате чего продукт «взрывается». Это «взрывание» контролируется путем регулирования температуры и давления. Если необходимо получить плотный продукт, то перед выходом из головки экструдера массу охлаждают, экструдированную массу нарезают на кусочки и перерабатывают в зависимости от назначения. Типовая технологическая схема текстуризации белков экструзией представлена на рис. 5.31.

Основные принципы этих двух методов включают термическую и щелочную денатурацию белков, придание денатурированному белку формы волокон, связывание волокон с использованием связующего и придание готовому продукту требуемого вкуса и аромата. Текстурированные растительные белки все чаще используют для полной или частичной замены мяса в изделиях из фарша (в пирожках с мясом, котлетах, соусах и т. д.).

5.5.8. Тестообразование

При вымешивании смеси пшеничной муки и воды (в соотношении примерно 3 1) образуется упругое тесто, пригодное для выпечки хлеба и других хлебобулочных изделий (см. работы [79, 80, 115]). Эти необычные характеристики теста обусловлены главным образом белками пшеничной муки.

В пшеничной муке содержится несколько растворимых и нерастворимых белковых фракций. Растворимые белки, составляющие около 20% от общего содержания белков, — это преимущественно альбумин и глобулин, а также небольшое количество гликопротеинов. Эти белки не играют особой роли в образо-

вании теста из пшеничной муки. Основным белком пшеницы является клейковина (глютен), представляющая собой гетерогенную белковую смесь (в основном глиадинов и глютенинов), ограниченно растворимую в воде. При смешивании с водой глютен образует вязкоупругое тесто, способное удерживать пузырьки газа при сбраживании.

Глютен характеризуется уникальным аминокислотным составом. Более 40% всех аминокислотных остатков составляют *Gln* и *Pro* (табл. 5.18). Низкая растворимость глютена обусловлена низким содержанием остатков *Lys, Arg, Glu и Asp*, в сумме составляющим менее 10% общего содержания аминокислотных остатков. Около 30% аминокислотных остатков глютена гидрофобны, что объясняет его способность образовывать белковые агрегаты путем гидрофобных взаимодействий и связывать жиры и другие неполярные вещества. Высокое содержание в глютене глютамина и гидроксильных аминокислот (около 10%) объясняет его способность связывать воду. Кроме того, водородные связи между глютамином и гидроксильными остатками глютеновых полипептидов обусловливают адгезивные и когезивные свойства теста. Содержание цистеина и цистина составляет 2–3 мол.% от общего содержания аминокислотных остатков глютена. При образовании теста эти остатки подвергаются сульфгидрильно-дисульфидным реакциям взаимообмена, приводящим к полимеризации глютеновых белков [115].

При замесе и вымешивании пшеничной муки и воды происходят определенные физические и химические трансформации. При наложении сил сдвига и растяжения белки глютена поглощают воду и частично раскручиваются, что облегчает гидрофобное взаимодействие и сульфгидрильно-дисульфидный взаимообмен, приводя к образованию нитеподобных полимеров. Считается, что эти линейные полимеры взаимодействуют друг с другом преимущественно путем водородного связывания, гидрофобной ассоциации и образования дисульфидных мостиков с образованием пленки, способной удерживать газ. В результате этих превращений глютена сопротивление теста механической обработке (по фаринографу) сначала возрастает до определенного максимума, а затем снижается, что свидетельствует о разрушении сетевой структуры. При таком разрушении происходит упорядочивание полимеров в направлении сдвига и некоторое разрушение дисульфидных мостиков, что уменьшает размер молекул полимера. Время, затрачиваемое на достижение максимальной силы теста (R_{max}) при замесе, используются как показатель качества хлебопекарной пшеницы («силы муки») — чем оно больше, тем выше качество муки.

Таблица 5.18
Аминокислотный состав глютенина и глиадина

Аминокислота	Содержание глютенина, мол.%	Содержание глиадина, мол.%
Cys	2,6	3,3
Met	1,4	1,2
Asp	3,7	2,8
Thr	3,4	2,4
Ser	6,9	6,1
Glx[a]	28,9	4,6
Pro	11,9	16,2
Gly	7,5	3,1
Ala	4,4	3,3
Val	4,8	4,8
Ile	3,7	4,3
Leu	6,5	6,9
Tyr	2,5	1,8
Phe	3,6	4,3
Lys	2,0	0,6
His	1,9	1,9
Arg	3,0	2,0
Trp	1,3	0,4

[a] *Glx* — это смесь *Glu* и *Gln*. Большая часть *Glx* в белке пшеницы присутствует в форме *Gln* [37].

Считается, что вязкоупругие свойства пшеничного теста обусловлены реакциями сульфгидрильно-дисульфидного взаимообмена. Такое представление подтверждается тем, что при добавлении в тесто восстановителей (типа цистеина или блокировщиков сульфгидрильных групп типа N-этилмалеимида) вязкоупругие свойства теста существенно ухудшаются. С другой стороны, добавление окислителей, например йодатов или броматов, повышает эластичность теста. Это означает, что богатый SH- и S—S-группами пшеничный глютен мог бы обладать отличными хлебопекарными свойствами, однако эта взаимосвязь не надежна. На вязкоупругие свойства пшеничного теста существенное влияние оказывают и другие взаимодействия, отличные от дисульфидных мостиков, например водородное связывание и гидрофобные взаимодействия.

Различия сортов пшеницы по их хлебопекарными свойствам обусловлено различным содержанием глютена. Как мы уже отмечали, глютен состоит из глиадинов и глютенинов. Глиадины делятся на четыре группы — α-,β-,γ- и ω-глиадины, которые присутствуют в глютене как одиночные полипептиды с молекулярной массой от 30 000 до 80 000 Да. У глиадинов четное число цистеиновых остатков, существующих в виде внутримолекулярных дисульфидных мостиков, скрыты внутри молекулы белка так, что они не могут принимать участия в реакциях сульфгидрильно-дисульфидного взаимообмена с другими белками. Эти дисульфидные мостики при приготовлении теста остаются неповрежденными, и тесто, приготовленное из изолированных глиадинов и крахмала — вязкое, но не вязкоупругое.

Глютенины же представляют собой гетерогенные полипептиды с молекулярной массой от 12 000 до 130 000 Да. Их подразделяют на высокомолекулярные (молекулярная масса > 90 000) и низкомолекулярные (молекулярная масса < 90 000). В глютене эти полипептиды существуют как связанные дисульфидными мостиками полимеры, сильно различающиеся по молекулярной массе. Благодаря способности полимеризоваться путем реакций сульфгидрильно-дисульфидного взаимообмена глютенины придают тесту эластичность. В некоторых работах указывается на положительную корреляцию между содержанием в глютене высокомолекулярных глютенинов и хлебопекарным качеством определенных сортов пшеницы [10]. Из имеющихся данных следует, что для хлебопекарного качества намного важнее определенный способ образования дисульфидных мостиков между низко- и высокомолекулярными глютенинами, чем собственно содержание высокомолекулярных белков. Например, ассоциация и полимеризация низкомолекулярных глютенинов дает структуру, аналогичную образованной высокомолекулярными глиадинами. Такой тип структуры обеспечивает вязкость теста, но не его упругость. И наоборот, упругость теста возрастает, когда низкомолекулярные глютенины в глютене образуют дисульфидные мостики с выскомолекулярными. Возможно, что в пшенице с высокими хлебопекарными свойствами преобладают низкомолекулярные глютенины, полимеризованные с высокомолекулярными, тогда как в пшенице с низкими хлебопекарными свойствами большинство низкомолекулярных глютенинов полимеризованы друг с другом. Эти различия в ассоциатах глютенинов в глютене различных сортов пшеницы можно отнести к различиям в их конформационных свойствах, в частности гидрофобности поверхности и реакционной способности сульфгидрильных и дисульфидных групп.

Подводя промежуточный итог, можно сказать, что свой вклад в уникальную вязкоупругую структуру пшеничного теста вносят водородное связывание амидных и гидроксильных групп, гидрофобные взаимодействия и реакции сульфгидрильно-дисульфидного взаимообмена. Результат этих взаимодействий в тесте зависит от структурных свойств каждого белка и тех белков, с которыми они ассоциируются в общей структуре глютена.

Поскольку полипептиды глютена, особенно глютенины, богаты пролином, они образуют слабоупорядоченную вторичную структуру. Какой бы упорядоченной ни была изначально структура глиадинов и глютенинов, при замесе она утрачивается, так что при выпечке дополнительного раскручивания молекул не происходит.

Обогащение пшеничной муки белками альбуминового и глобулинового типа (например, сывороточными или соевыми белками) неблагоприятно сказывается на вязкоупругих и хлебопекарных свойствах теста. Такие белки снижают объем хлеба из-за их проникновения в структуру глютена. Внесение в тесто фосфолипидов или других поверхностно-активных веществ подавляет нежелательное влияние этих посторонних белков на объем хлеба. В данном случае слабость глютеновой пленки компенсируется пленкой из ПАВ/белка. Несмотря на то что данный способ позволяет обеспечить приемлемый объем хлеба, структурные и органолептические свойства такого хлеба уступают традиционному.

Иногда в качестве белка в невыпечных изделиях используют изолят глютена, хорошие когезионные и адгезионные свойства делают его эффективным связующим для мясного фарша и продуктов типа сурими (рыбного фарша).

5.6. Белковые гидролизаты

Одним из важных способов улучшения функциональных свойств белков — растворимости, диспергируемости, пенообразующих и эмульгирующих — является частичный гидролиз белка под действием протеолитических ферментов. Белковые гидролизаты находят применение в производстве пищевых продуктов специального назначения — для пожилых, детского питания без аллергенов, спортивных напитков и диетических продуктов. Поскольку гидролизаты белков легко перевариваются, они особенно полезны для детского питания и продуктов для пожилых людей.

Протеолиз — это ферментативный гидролиз пептидных связей белков:



(5.73)

В этой реакции при расщеплении ферментом одной пептидной связи высвобождается по 1 молю карбоксильной и аминогрупп. По завершении реакции конечный продукт представляет собой смесь всех составляющих данный белок аминокислот. Неполный протеолиз дает смесь полипептидов первоначального белка. Функциональные свойства белковых гидролизатов зависят от степени гидролиза (*DH*) и физико-химических свойств полипептидов гидролизата — размера молекулы, растворимости и т. д. Степень гидролиза определяется как доля расщепленных полипептидных связей и выражается в процентах:

$$DH,\% = \frac{n}{n_T} \cdot 100, \tag{5.74}$$

где n_T — общее количество (в молях) пептидных связей в 1 моле белка; n — количество разрушенных пептидных связей в 1 моле белка.

Если молекулярная масса белка неизвестна или образец белка — это смесь различных белков, то показатели n и n_T относятся к числу пептидных связей в 1 г белка.

Степень гидролиза обычно контролируют методом pH-титрования. Этот метод основан на том, что при гидролизе пептидных связей вновь образованные карбоксильные группы полностью ионизируются при pH > 7, что приводит к росту концентрации ионов H^+ В области pH 7–8 число молей высвободившихся ионов H^+ эквивалентно числу молей гидролизованных пептидных связей. При pH-титрометрии значение pH белкового раствора поддерживается постоянным путем титрования с NaOH. Число молей израсходованного NaOH эквивалентно числу молей разрушенных пептидных связей.

Для получения гидролизатов белка можно использовать несколько протеаз, некоторые из которых относятся к сайт-специфичным (табл. 5.19). Благодаря специфичности протеаз типы гидролизованных полипептидных фрагментов отличаются. Основным промышленным ферментом для получения гидролизатов белка является алкалаза из *Bacillus licheniformis*, относящаяся к семейству субтилизинов (протеаз серина).

5.6.1. Функциональные свойства белковых гидролизатов

Функциональные свойства белковых гидролизатов зависят от типа используемых для их получения ферментов (из-за различий размера и других физико-химических свойств молекул полипептидов, высвобождающихся в процессе гидролиза). Как правило, растворимость большинства белков после гидролиза улучшается независимо от использовавшегося фермента. Чем выше степень гидролизации, тем более растворим гидролизат, однако общее повышение растворимости зависит от типа используемого фермента. На рис. 5.32 приведен график зависимости растворимости казеина от значения pH до и после гидролиза с использованием протеазы *V*-8 [2]. Следует отметить, что растворимость казеина в изоэлектрической точке после неполного гидролиза значительно возрастает. Такое поведение свойственно и другим белкам. Повышенная растворимость особенно важна для производства кислых белковых напитков, для которых нежелательно выпадение осадка.

Таблица 5.19
Специфичность различных протеаз

Протеаза	Тип	Специфичность
Эластаза	Эндопротеиназа	*Ala—aa; Gly—aa*
Бромелаин	То же	*Ala—aa; Tyr—aa*
Трипсин		*Lys—aa; Arg—aa*
Химотрипсин		*Phe—aa; Trp—aa; Tyr—aa*
Пепсин		*Leu—aa; Phe—aa*
Протеаза *V*-8		*Asp—aa; Glu—aa*
Термолизин		*aa—Phe; aa—Leu*
Алкалаза		Неспецифична
Папаин		*Lys—aa; Arg—aa; Phe—aa; Gly—aa*
Пропилендопептидаза		*Pro—aa*
Субтилизин А	—"—	Неспецифична

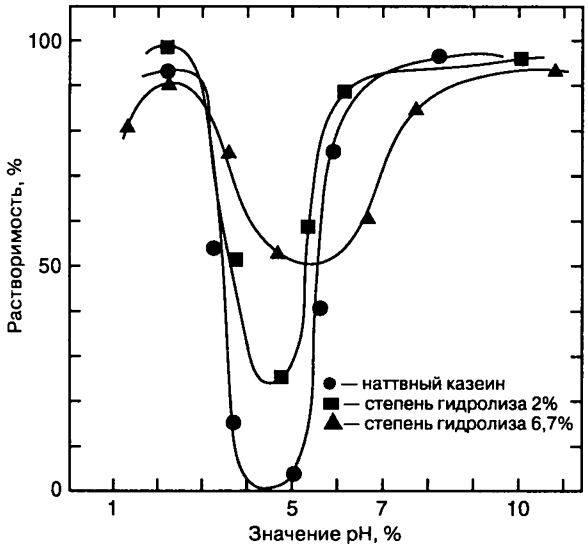


Рис. 5.32. Зависимость растворимости нативного казеина и казеина, модифицированного протеазой *V*-8 из *Staphylococcus aureus*, от значения pH. Растворимость выражена в процентах от общего содержания белка в растворе. По [2]

Таблица 5.20
Требования к прочности по Блуму для некоторых продуктов на основе желатина

Пищевой продукт	Прочность геля по Блуму, г	Массовая доля желатина, %
Желейные конфеты	220	7–8
Фруктовое желе	100–120	10–12
Маршмеллоу	220	2–3
Лозинджис (пастилки)	50–100	

Поскольку растворимость белка важна для пенообразующих и эмульгирующих свойств, частично гидролизованные белки обычно характеризуются улучшенными пенообразующими и эмульгирующими свойствами. Это, однако, зависит от типа используемого фермента и степени гидролиза. Как правило, пенообразующие и эмульгирующие свойства при значениях $DH < 10\%$ улучшаются, а при $DH > 10\%$ ухудшаются. С другой стороны, стойкость пен и эмульсий, полученных с использованием белковых гидролизатов, как правило, меньше, чем с применением негидролизованного белка. Одна из причин этого заключается в неспособности низкомолекулярных полипептидов образовывать когезионные вязкоэластичные пленки на границе раздела фаз «воздух–вода» и «масло–вода».

Гидролизаты белка при тепловой обработке обычно не образуют гели. Исключением является желатин, получаемый при кислотном или щелочном гидролизе коллагена. Желатин представляет собой гетерогенную смесь полипептидов, средняя молекулярная масса которых в желатине зависит от степени гидролиза, что сильно влияет на прочность геля. Чем больше эта средняя молекулярная масса, тем более прочен гель. Образец желатина со средней молекулярной массой полипептидов < 20 000 Да не образует геля при любой концентрации желатина [43]. Гелеобразующие свойства промышленно выпускаемых видов желатина оценивают по Блуму с использованием соответствующим образом градуированного пенетрометра. Прочность геля по Блуму — это сила (г), необходимая для погружения стержня пенетрометра на 4 см в желатиновый гель (6,67 %масс./об.), предварительно выдержанный на водяной бане при 10 °С в течение 17 ч. Основные показатели прочности гелей по Блуму для различных пищевых продуктов на основе желатина приведены в табл. 5.20.

5.6.2. Аллергенные свойства

Некоторые пищевые белки, включая молочные и соевые белки, глютен, яичный белок, белки арахиса, могут вызывать у взрослых и детей аллергические реакции. Среди лиц, имеющих аллергию на молочный белок, около 60% реагируют на казеин, 60–80% —на β-лактоглобулин, и 50% — на α-лактоальбумин [1]. Вместе с тем гидролизаты этих белков обладают более низкими аллергенными свойствами по сравнению с нативными белками.

Аллергенность нативных белков обусловлена наличием антигенных участков (эпитопов), связывающихся с иммуноглобулином Е (*IgE*). В белковых гидролизатах эти эпитопы в ходе протеолиза разрушаются. Например, гидролиз казеина панкреатином (смесь панкреатических ферментов) до степени гидролизации 55% снижает его аллергенность на 50% [81]. Аналогичным образом гидролизаты сывороточного белка со степенью гидролизации 12,9–16,1% характеризуются меньшим числом аллергических реакций (при испытаниях на морских свинках, сенсибилизированных нативным сывороточным белком) [97]. С учетом этого для маленьких детей и детей, предрасположенных к аллергическим реакциям на пищевые белки, белковые гидролизаты являются более предпочтительными источниками белка и аминокислот.

Степень снижения аллергенности белковых гидролизатов зависит от типа используемой протеазы. Неспецифичные протеазы или смеси протеаз более эффективно снижают аллергенность белков, чем специфичные. Кроме того, выявлена зависимость от степени гидролиза: чем она выше, тем больше снижается аллергенность. Для выражения эффективности действия протеаз на снижение аллергенности белков используется «Индекс снижения аллергенности» (*ARI*), который определяется как отношение снижения аллергенности (%) к степени гидролиза (%).

5.6.3. Горькие пептиды

Одним из самых нежелательных свойств белковых гидролизатов является их горечь, которую придают им некоторые образующиеся при гидролизе пептиды. Имеются явные свидетельства, что эта горечь пептидов обусловлена гидрофобностью. Пептиды со средней гидрофобностью остатков менее 1,3 ккал/моль не дают горького привкуса (см. главу 10), тогда как пептиды со средней гидрофобностью остатков более 1,4 ккал/моль — горькие [3]. По этой причине среднюю гидрофобность пептидов зачастую рассчитывают по свободной энергии перехода аминокислотных остатков из этанола в воду (см. табл. 10.1 в главе 10). Образование горьких пептидов в белковых гидролизатах зависит от состава и последовательности аминокислот, а также типа используемых ферментов. Гидролизаты сильно гидрофобных белков — казеина, соевых белков и кукурузного белка (зеина) — очень горькие, тогда как гидролизаты гидрофильных белков (например, желатина) менее горькие. Казеины и соевые белки, гидролизованные некоторыми промышленными протеазами, дают горькие пептиды, горечь которых можно снизить или вообще удалить с помощью смеси эндо- и экзопептидаз, разрушающих горькие пептиды на фрагменты со средней гидрофобностью остатков менее 1,3 ккал/моль.

5.7. Нутритивные свойства белков

Белки обладают разной биологической ценностью, и эти различия обусловлены такими факторами, как содержание незаменимых (эссенциальных) аминокислот и усвояемость. Следовательно, суточная норма потребления белка зависит от типа и состава белков в рационе.

5.7.1. Качество белка

Характеристика «качество белка» относится, главным образом, к содержанию в них эссенциальных аминокислот и усвояемости данного белка. Высококачественные белки — это белки, содержащие все эссенциальные аминокислоты в количестве, превышающем эталонный уровень, установленный Организацией ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства (ФАО), Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Университетом ООН (УООН) [40], усвояемость которых сопоставима или выше усвояемости яичного или молочного белков. С учетом этого «качество» белков животного происхождения выше, чем растительных белков.

Белки большинства зерновых и бобовых культур зачастую лимитированы, по крайней мере, одной из эссенциальных аминокислот. Если белки таких зерновых культур, как рис, пшеница, ячмень и кукуруза, богаты метионином и содержат очень мало лизина, то в семенах бобовых растений и масличных культур, напротив, содержится недостаточно метионина, но зато они богаты лизином или содержат его в достаточном количестве, однако в белках арахиса мало и метионина, и лизина. Эссенциальные аминокислоты, содержание которых в тех или иных белках ниже, чем в эталонном белке, называют *лимитирующими*. Взрослые, потребляющие только белки злаковых или бобовых культур, испытывают проблемы со здоровьем, а у детей младше 12 лет, потребляющих с пищей только белки из этих источников, снижается скорость роста. Содержание эссенциальных аминокислот в различных пищевых белках приведено в табл. 5.21 [35, 40].

В белках, как животного, так и растительного происхождения, как правило, содержится достаточное или избыточное количество гистидина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и тирозина, а также валина. Эти аминокислоты в пищевых продуктах обычно не являются лимитирующими, к которым чаще всего относятся лизин, треонин, триптофан и серосодержащие аминокислоты. Биологическую ценность белка, в котором наблюдается дефицит незаменимых аминокислот, можно исправить путем его сочетания с другими белками, в которых их больше. Так, сочетание белков зерновых и бобовых культур обеспечивает полный и сбалансированный уровень незаменимых аминокислот, то есть рацион, состоящий из соответствующего количества зерновых и бобовых, как правило, достаточен для обеспечения роста и жизнедеятельности организма. Биологическую ценность белков низкого «качества» можно повысить путем обогащения их свободными незаменимыми аминокислотами, содержание которых в данном белке недостаточно. Например, обогащение (сапплементация) бобовых метионином, а злаковых культур — лизином обычно повышает их нутритивное качество.

Биологическая ценность белков или их смеси идеальна в том случае, когда в них содержатся все эссенциальные аминокислоты, причем в таком соотношении, которое обеспечивает оптимальные жизнедеятельность и темпы роста (табл. 5.22) [108]. Тем не менее, так как реальная потребность в незаменимых аминокислотах для каждого человека в данной группе населения зависит от его пищевого и физиологического статуса, в качестве безопасного уровня для всех возрастных групп рекомендуется придерживаться норм относительно эссенциальных аминокислот для детей дошкольного возраста (от 2 до 5 лет) [39].

Избыточное потребление какой-то аминокислоты может привести к «антагонизму аминокислот» и пищевому отравлению. Чрезмерное потребление аминокислот зачастую приводит в результате к увеличению потребности в других эссенциальных аминокислотах (вследствие конкуренции аминокислот за участки всасывания в кишечнике). Так, повышенное содержание лейцина снижает всасывание изолейцина, валина и тирозина, даже если в рационе эти аминокислоты присутствуют в достаточном количестве, что приводит к увеличению потребности организма в этих трех аминокислотах. Избыточное потребление других аминокислот может также замедлять развитие и приводить к развитию тех или иных патологий.

5.7.2. Усвояемость

Хотя содержание эссенциальных аминокислот является основным показателем качества белка, истинное его качество зависит также от степени усвояемости данного белка организмом, то есть и от усвояемости и биологической ценности аминокислот. Усвояемость различных белков приведена в табл. 5.23 [40]. Пищевые белки животного происхождения усваиваются лучше, чем растительного.

Усвояемость белков зависит от нескольких факторов, которые мы рассмотим далее.

5.7.2.1. Конформация белка

Гидролиз белков протеазами зависит от структурного состояния белка. Нативные белки, как правило, гидролизованы меньше, чем частично денатурированные. Например, обработка фазеолина (белка фасоли) смесью протеаз обусловливает лишь частичное расщепление белка, высвобождая в основном полипептиды с молекулярной массой 22 000 Да. Если денатурированный в ходе тепловой обработки фазеолин подвергнуть расщеплению в тех же условиях, то он полностью гидролизуется до аминокислот и дипептидов. Как правило, нерастворимые фибриллярные и полностью денатурированные глобулярные белки с трудом гидролизуются.

Таблица 5.21

Содержание эссенциальных аминокислот, мг/г белка и биологическая ценность различных пищевых белков. По [35–40]

Аминокислота и биологическая ценность	Источник белка												
	Яичный белок	Коровье молоко	Говядина	Рыба	Пшеница	Рис	Кукуруза	Ячмень	Соевые бобы	Кормовой горох, вареный	Зеленый горошек	Арахис	Фасоль обыкновенная
Гистидин	22	27	34	35	21	21	27	20	30	26	26	27	30
Изолейцин	54	47	48	48	34	40	34	35	51	41	41	40	45
Лейцин	86	95	81	77	69	77	127	67	82	71	70	74	78
Лизин	70	78	89	91	23[a]	34[a]	25[a]	32[a]	68	63	71	39[a]	65
Метионин + + цистеин	57	33	40	40	36	49	41	37	33	22[b]	24[b]	32	26
Фенилаланин + + тирозин	93	102	80	76	77	94	85	79	95	69	76	100	83
Треонин	47	44	46	46	28	34	32[b]	29[b]	41	33	36	29b	40
Триптофан	17	14	12	11	10	11	6[b]	11	14	8[a]	9[a]	11	11
Валин	66	64	50	61	38	54	45	46	52	46	41	48	52
Общее содержание эссенциальных аминокислот	512	504	480	485	336	414	422	356	466	379	394	400	430
Содержание белка, %	12	3,5	18	19	12	7,5			40	32	28	30	30
Химическая оценка, % (по данным ФАО/ВОЗ, норма 1985 г.)	100	100	100	100	40	59	43	55	100	73	82	67	
PER	3,9	3,1	3,0	3.5	1,5	2,0	—	—	2,3	—	2,65		—
BV (на крысах)	94	84	74	76	65	73		—	73	—	—	—	—
NPU	94	82	67	79	40	70	—	—	61	—	—		—

[a] Первично лимитирующие кислоты

[b] Вторично лимитирующие кислоты.

Примечание. *PER, Protein efficiency ratio* — коэффициент эффективности белка; *BV, Biological value* — биологическая ценность; *NPU, Net protein utilization* — чистая усвояемость белка.

Таблица 5.22
Рекомендуемые нормы потребления эссенциальных аминокислот с пищевыми белками. По [40]

Аминокислота	Рекомендуемая норма, мг/г белка			
	Дети в возрасте до 2 лет	Дети в возрасте от 2 до 5 лет	Дети в возрасте 10–12 лет	Взрослые
Гистидин	26	19	19	16
Изолейцин	46	28	28	13
Лейцин	93	66	44	19
Лизин	66	58	44	16
Метионин + Цистеин	42	25	22	17
Фенилаланин + Тирозин	72	63	22	19
Треонин	43	34	28	9
Триптофан	17	11	9	5
Валин	55	35	25	13
Всего:	434	320	222	111

Таблица 5.23
Усвояемость различных пищевых белков человеком. По [40]

Источник белка	Усвояемость, %	Источник белка	Усвояемость, %
Яйца	97	Просо	79
Молоко, сыр	95	Зеленый горошек	88
Мясо, рыба	94	Арахис	94
Кукуруза	85	Соевая мука	86
Рис (шлифованный)	88	Изолят соевого белка	95
Пшеница цельнозерновая	86	Фасоль	78
Пшеничная мука высшего или первого сорта	96	Кукуруза (зерно)	70
Пшеничный глютен (клейковина)	99	Пшеница (зерно)	77
Овсяные хлопья	86	Рис (зерно)	75

5.7.2.2. Факторы, снижающие биологическую ценность

Большинство изолятов и концентратов растительного белка содержат ингибиторы трипсина и химотрипсина (типа Кунитца и типа Баумана–Бирка), а также лектины. Эти ингибиторы препятствуют полному гидролизу белков из бобовых и масличных культур панкреатическими протеазами. Лектины, представляющие собой гликопротеины, связываются с клетками слизистой кишечника и препятствуют всасыванию аминокислот. Лектины и ингибиторы протеаз типа Кунитца термолабильны, тогда как ингибиторы типа Баумана–Бирка термостойки. Таким образом, белки бобовых и масличных культур после тепловой обработки лучше усваиваются, чем изоляты нативных белков (несмотря на некоторое остаточное содержание в них ингибитора типа Баумана–Бирка). Растительные белки содержат и другие вещества, снижающие биологическую ценность, а именно таннины и фитаты. Таннины, являющиеся продуктами конденсации полифенолов, ковалентно связываются с ε-аминогруппами остатков лизина, что препятствует катализируемому трипсином расщеплению полипептидов на сайтах связывания лизина.

5.7.2.3. Промышленная переработка

Скорость и полноту гидролиза снижает также взаимодействие белков с полисахаридами и пищевыми волокнами, что важно при экструзии пищевых продуктов в условиях высоких температур и давления. Вследствие подверженности остатков лизина воздействию высоких температур и щелочного диапазона pH белки претерпевают некоторую химическую перестройку, снижающую их усвояемость. Усвояемость лизина снижается также из-за реакции редуцирующих сахаров с ε-аминогруппами.

5.7.3. Оценка биологической ценности белков

Поскольку биологическая ценность белков может значительно различаться и зависит от многих факторов, очень важно пользоваться проверенными методами определения их качества. Оценка качества белка позволяет определить его количество, необходимое для обеспечения безопасного уровня потребления эссенциальных аминокислот для поддержания жизнедеятельности и темпов развития организма, а также контролировать изменение биологической ценности белков при переработке пищевых продуктов в целях подбора таких технологических режимов, при которых качество белка снижается в минимальной степени. Биологическую ценность белков можно оценивать различными биологическими, химическими и ферментативными методами.

5.7.3.1. Биологические методы

Биологические методы основаны на анализе темпов прироста массы тела или ретенции азота подопытными животными, получающими белковый корм, по сравнению с контрольной группой, получающей безбелковый корм. Для оценки качества белка, как правило, используется протокол ФАО/ВОЗ [39]. Обычно подопытными животными служат крысы, но иногда применяют и испытания на людях. Для подтверждения того, что количество потребляемого белка ниже суточной нормы, используют рацион с содержанием белка около 10% (по сухой массе), причем энергетическая ценность данного рациона обеспечивается. В этих условиях пищевые белки усваиваются в максимальной для развития организма степени. Количество подопытных животных должно быть достаточным для получения достоверных статистических результатов. Как правило, эксперимент длится 9 сут, и ежедневно в таблицу заносят количество потребленной каждым животным пищи (в граммах), а для анализа на азот собирают экскременты и мочу.

Полученные данные затем используют для расчета качества белка несколькими способами. Коэффициент эффективности белка (*PER*) определяют как прибавку массы тела (в граммах) на 1 г потребленного белка. Применяют и другой показатель — коэффициент чистой эффективности белка (*NPR, Net protein ratio*), который рассчитывают по следующей формуле:

$$NPR = \frac{(\text{увеличение массы тела}) - (\text{потеря массы тела у безбелковой группы})}{\text{количество усвоенного белка}}. \qquad (5.75)$$

Данные по *NPR* дают информацию о способности белка к поддержанию жизнедеятельности и роста. Поскольку крысы растут гораздо быстрее, чем человек, а для развития ребенка требуется больший процент белка, чем для крыс, встает вопрос о применимости для человека значений *PER* и *NPR*, полученных в опытах на крысах [108]. Несмотря на обоснованность данного аргумента, разработана соответствующая процедура корректировки результатов.

Еще один подход к оценке качества белка основан на расчете потребления и потерь азота. С его помощью можно рассчитать два важных параметра качества белка. *Кажущаяся усвояемость белка* (или *коэффициент усвоения белка*) рассчитывают по разнице между количеством усвоенного азота и его количеством в фекалиях, однако поскольку общее количество азота в фекалиях включает метаболический или эндогенный азот, для получения *истинной усвояемости белка* (ИУ, *TD*) необходимо ввести поправку:

$$TD = \frac{I - (F_N - F_{k,N})}{I} \cdot 100, \qquad (5.76)$$

где I — количество усвоенного азота; F_N — общее количество азота в фекалиях; $F_{k,N}$ — эндогенный азот в фекалиях. Значение $F_{k,N}$ рассчитывают по безбелковому рациону.

Показатель ИУ (*TD*) дает информацию о проценте всасываемого азота в организме, но никак не свидетельствует о том, какое количество этого всасываемого азота фактически удержано или утилизировано организмом.

Показатель биологической ценности (*BV*) рассчитывают по формуле

$$BV = \frac{I - (F_N - F_{k,N}) - (U_N - U_{k,N})}{I - (F_N - F_{k,N})} \cdot 100, \qquad (5.77)$$

где U_N и $U_{k,N}$ — это соответственно потери общего и эндогенного азота с мочой.

Таким образом, показатель *NPU* (чистой утилизации белка) определяется как процентное отношение поглощенного и удержанного в организме азота. Рассчитывают его как произведение *TD* на *BV*, то есть,

$$NPU = TD \times BV = \frac{I - (F_N - F_{k,N}) - (U_N - U_{k,N})}{I} \cdot 100. \quad (5.78)$$

Значения показателей *PER*, *BV* и *NPU* для различных пищевых продуктов приведены выше в табл. 5.21.

К другим биопробам, иногда применяющимся для оценки качества белка, относятся биопробы на ферментативную активность, на изменение содержания эссенциальных аминокислот в плазме крови, на содержание мочевины в плазме крови и моче, на скорость насыщения плазмы крови белками, а также на темпы увеличения массы тела подопытных животных, получавших ранее безбелковый корм.

5.7.3.2. Химические методы

Биологические методы очень дорогостоящие и требуют значительного времени. Быстро оценить биологическую ценность белков можно путем определения содержания в них аминокислот и сопоставления полученных данных с идеальной комбинацией эссенциальных аминокислот. Идеальная комбинация эссенциальных аминокислот белков (по эталонному белку) для детей в возрасте от 2 до 5 лет приведена выше в табл. 5.22 [40]. Она используется в качестве стандарта для всех возрастных групп за исключением новорожденных. Каждой эссенциальной аминокислоте в анализируемом белке дается *химическая оценка (скор)*, которую получают по следующей формуле:

$$\frac{\text{Содержание аминокислоты, мг/г испытываемого белка}}{\text{Содержание той же аминокислоты, мг/г эталонного белка}} \times 100. \quad (5.79)$$

Эссенциальные аминокислоты с минимальным химическим скором являются наиболее лимитирующими аминокислотами данного белка. Химический скор данной лимитирующей аминокислоты определяет химический скор анализируемого белка. Как мы уже отмечали, зачастую лимитирующими аминокислотами пищевых белков являются лизин, тирозин, триптофан и серосодержащие аминокислоты, так что для оценки биологической ценности белка достаточно знать химический скор этих аминокислот. Он позволяет рассчитать, какое количество анализируемого белка или смеси белков обеспечивает требуемое суточное потребление лимитирующих аминокислот. Расчет проводят по формуле

$$\text{Требуемое потребление белка} = \frac{\text{Рекомендуемое потребление яичного или молочного белка}}{\text{Химический скор белка}} \cdot 100. \quad (5.80)$$

Одним из преимуществ этого метода является его простота, а также то, что он позволяет определить комплементарные эффекты белков в рационе. Кроме того, с его помощью можно составлять рационы с высококачественными белками путем комбинирования различных белков для разных диетических программ. Вместе с тем у данного метода есть и некоторые недостатки. В его основе лежит допущение, что все анализируемые белки усваиваются полностью и одинаково, то есть все эссенциальные аминокислоты всасываются полностью. Поскольку это допущение зачастую не выполняется, не удается получить хорошую корреляцию результатов с результатами, полученными биологическими методами (ее можно повысить, если в расчетах химического скора учитывать усвояемость белка). Кажущуюся усвояемость белка можно быстро определить *in vitro* при использовании комбинации трех-четырех ферментов (например, трипсина, химотрипсина, пептидазы и бактериальной протеазы).

Еще одним недостатком метода химического скора является то, что в нем не учитывается различие *D*- и *L*-аминокислот. Так как животными усваиваются только *L*-аминокислоты, метод химического скора дает завышенную оценку биологической ценности белков (особенно в условиях высоких значений pH, обусловливающих рацемизацию). С помощью химического скора нельзя также спрогнозировать негативные влияния высокой концентрации одной из аминокислот на биодоступность других эссенциальных аминокислот, а также эффект таких «антиалиментарных» факторов, как действие ингибиторов протеаз и лектинов, которые могут присутствовать в рационе. Несмотря на эти недостатки, последние получен-

ные данные свидетельствуют, что химический скор белков с коррекцией на усвояемость хорошо коррелируют с данным биологической оценки белков, у которых показатель *BV* выше 40% (если он ниже, то корреляция плохая) [39].

5.7.3.3. Ферментативные и микробиологические методы

Для определения усвояемости и высвобождения эссенциальных аминокислот применяются ферментативные методы *in vitro*. По одному из таких методов испытываемый белок сначала расщепляют пепсином, а затем панкреатином (сухим экстрактом панкреатина сублимационной сушки) [83]. По другому методу белки в стандартных условиях анализа разлагаются тремя ферментами — трипсином поджелудочной железы, химотрипсином и свиной кишечной пептидазой [39]. Помимо информации об усвояемости белков эти методы полезны для выявления изменения в качестве белков в ходе промышленной переработки.

Для определения биологической ценности белков применяют также микробиологические методы, в частности анализ роста и размножения некоторых микроорганизмов (*Streptococcus zymogenes, Streptococcus faecalis, Leuconostoc mesenteroides, Clostridium perfringens* и простейших (*Tetrahymena pyriformis*) [44]. Особенно полезны *T. pyriformis*, поскольку их потребность в аминокислотах сходна с потребностями крыс и человека.

5.8. Физические и химические изменения белков при промышленной переработке. Изменения пищевой ценности

К видам промышленной переработки пищевых продуктов относят тепловую обработку (нагревание), охлаждение (замораживание), сушку, применение химических реагентов, ферментацию, облучение и другие виды обработки. Наиболее распространенной, естественно, является тепловая обработка, которую обычно проводят для инактивации микроорганизмов и эндогенных ферментов, вызывающих окисление и гидролитические изменения пищевых продуктов при хранении, а также для превращения малопривлекательной смеси необработанных пищевых ингредиентов в полезный для здоровья и приятный по своим органолептическим свойствам продукт. Кроме того, некоторые белки, например бычий β-лактоглобулин и α-лактальбумин, а также соевый белок иногда могут вызывать аллергические реакции или реакцию гиперчувствительности, а при термической денатурации они теряют эти свои негативные свойства. К сожалению, благоприятные эффекты, достигаемые путем нагревания белковых пищевых продуктов, как правило, сопровождаются изменениями, негативно сказывающимися на биологической ценности и функциональных свойствах белков. Далее в этом разделе мы рассмотрим как положительное, так и нежелательное влияние на белки промышленной переработки пищевых продуктов.

5.8.1. Изменение пищевого качества белков и образование токсичных соединений

5.8.1.1. Влияние умеренной тепловой обработки

Большинство пищевых белков при умеренных режимах тепловой обработки (60–90 °С в течение не более 1 ч) денатурируются. Денатурация белков зачастую обусловливает снижение их растворимости, что ухудшает зависящие от растворимости функциональные свойства. С точки зрения качества пищи частичная денатурация белков улучшает усвояемость и биодоступность незаменимых аминокислот. Некоторые очищенные растительные белки и препараты на основе яичного белка, даже в очищенном от ингибиторов протеаз виде характеризуются недостаточной усвояемостью *in vitro* и *in vivo*. Умеренная тепловая обработка улучшает их усвояемость без образования токсичных производных.

Помимо улучшения усвояемости в ходе умеренной тепловой обработки инактивируются некоторые ферменты, в частности протеазы, липазы, липоксигеназы, амилазы, полифенолоксидазы, а также другие окислительные и гидролитические ферменты. Недостаточная инактивация этих ферментов приводит при хранении продуктов к появлению посторонних привкусов и запахов, прогорклости, к изменениям текстуры и обесцвечиванию. Например, в масличных и бобовых культурах содержится много липоксигеназы.

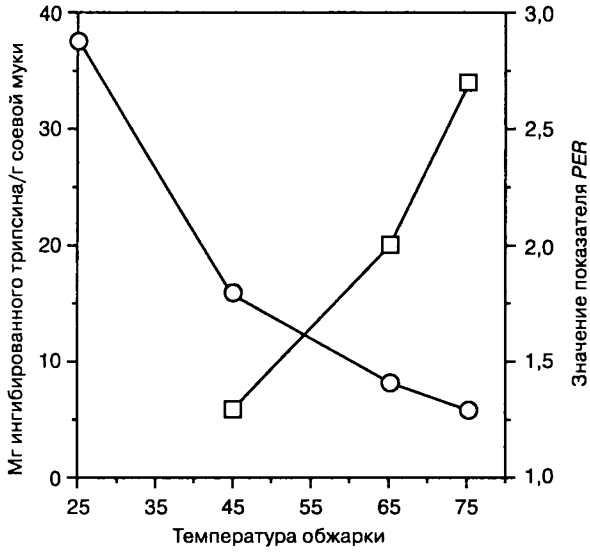


Рис. 5.33. Влияние обжарки на активность ингибиторов трипсина и значение *PER* соевой муки. По [45]

При их измельчении в целях экстракции масла или белковых изолятов этот фермент в присутствии кислорода катализирует окисление полиненасыщенных жирных кислот до гидропероксидов, которые затем разлагаются с образованием альдегидов и кетонов, которые и приводят к появлению у соевой муки, а также у концентратов и изолятов соевого белка постороннего привкуса. Во избежание появления этого привкуса необходимо инактивировать липогеназу путем тепловой обработки перед измельчением семян или бобов.

Умеренная тепловая обработка особенно полезна для растительных белков, так как в них обычно содержатся «антиалиментарные» для белка вещества. Мы уже отмечали, что в белках бобовых и масличных культур содержатся ингибиторы трипсина и химотрипсина, которые ухудшают усвояемость белков и, соответственно, снижают их биодоступность. Таким образом, инактивация или комплексообразование трипсина и химотрипсина этими ингибиторами индуцирует повышенную выработку этих ферментов поджелудочной железой, что может привести к гипертрофии и аденоме поджелудочной железы. В белках бобовых и масличных культур содержатся также лектины, представляющие собой гликопротеины (они известны и как фитогемагглютинины, так как вызывают агглютинацию красных кровяных телец — эритроцитов). Лектины характеризуются высоким сродством к углеводам, и при потреблении их человеком ухудшают усвоение белка [103] и приводят к нарушению всасывания в кишечнике других нутриентов. Последнее обусловлено связыванием лектинов с мембранными гликопротеинами слизистой кишечника, из-за чего меняется их морфология и транспортные свойства [96]. И ингибиторы протеаз, и лектины растительных белков являются термолабильными. Обжарка бобов и семян масличных растений, а также пропаривание соевой муки инактивирует и лектины, и ингибиторы протеаз, улучшая тем самым усвояемость белков и их показатель *PER* (рис. 5.33) [45], а также предупреждая гипертрофию поджелудочной железы [53]. Эти «антиалиментарные» факторы не создают особых проблем при промышленной и кулинарной обработке продуктов из бобовых или на основе муки, поскольку применяемые режимы тепловой обработки нивелируют указанные факторы.

Некоторые ингибиторы протеаз содержатся также в яичном и молочном белке. Около 11% яичного альбумина составляет овомукоид, обладающий противотрипсиной активностью, а в яичном белке содержится около 0,1% овоингибитора, подавляющий действие трипсина, химотрипсина и некоторых грибковых протеаз. В молоке присутствуют несколько ингибиторов протеаз, в частности ингибитор плазминогенового активатора (*PAI*) и ингибитор плазмина (*PI*), образующиеся в крови. Все эти ингибиторы при умеренной тепловой обработке в присутствии воды инактивируются.

К положительным эффектам тепловой обработки можно отнести также инактивацию белковых токсинов, в частности, ботулиновый токсин, продуцируемый *Clostridium botulinum* и инактивирующийся при температуре 100 °С, и энтеротоксин, продуцируемый золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*).

5.8.1.2. Изменения в составе белков при экстракции и фракционировании

Изоляты белка получают из биологического сырья с помощью различных технологических операций — экстракции, изоэлектрического осаждения, термокоагуляции, ультра- и диафильтрации. Весьма вероятно, что некоторые белки из неочищенного экстракта могут в ходе этих операций теряться. Например, при изоэлектрическом осаждении некоторые богатые серой альбуминоподобные белки, которые обычно в изоэлектрической точке растворимы, могут оставаться в надосадочной жидкости (супернатанте). Эти

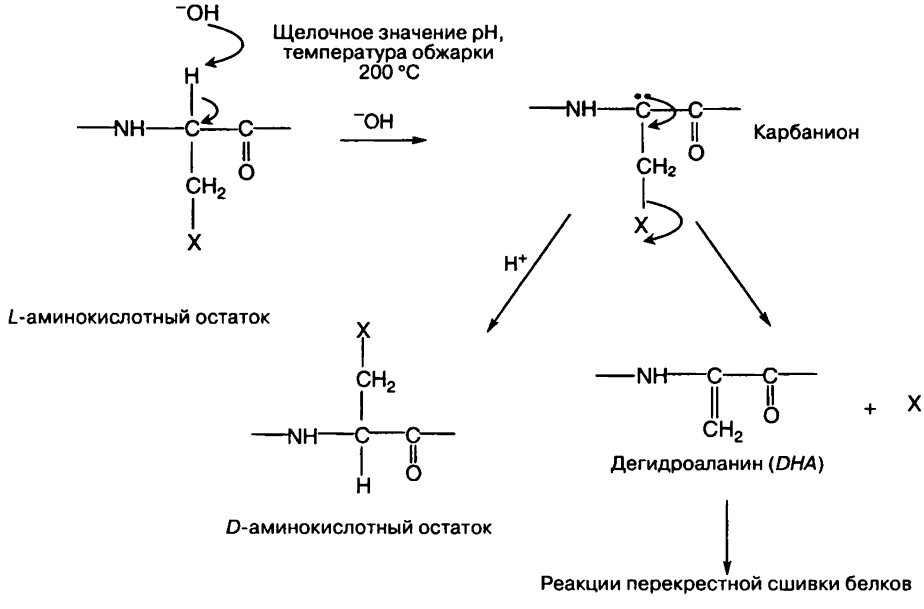
потери могут изменять аминокислотный состав и биологическую ценность изолятов белка по сравнению с исходным неочищенным экстрактом. Например, в концентратах сывороточного белка, полученных ультра- или диафильтрацией и ионообменными методами, происходят существенные изменения протеозо-пептонного состава, что заметно сказывается на их пенообразующих свойствах.

5.8.1.3. Химические изменения аминокислот

При высокотемпературной обработке в белках происходят определенные химические превращения — рацемизация, гидролиз, десульфурация (потери серы) и дезамидирование. Большинство из них необратимы, причем в ходе некоторых указанных реакций образуются потенциально токсичные структурно-модифицированные типы аминокислот.

5.8.1.3.1. Рацемизация

Тепловая обработка белков при щелочных значениях pH, проводимая для получения текстурированных продуктов, неизбежно связана с частичной рацемизацией *L*-аминокислотных остатков до *D*-аминокислот [77]. Некоторая рацемизация аминокислот происходит и при кислотном гидролизе белков [42], и при обжарке белков или белковых пищевых продуктов при температурах выше 200 °C [55]. При щелочных значениях pH механизм рацемизации заключается сначала в захвате гидроксил-ионом протона от атома α-углерода. Получающийся карбанион утрачивает свою тетраэдрическую асимметрию, и последующее присоединение протона из раствора происходит либо сверху, либо снизу данного карбаниона. Равная вероятность этого приводит к рацемизации аминокислотных остатков (см. уравнение 5.81) [77]. Скорость рацемизации остатка зависит от силы электроноакцепторной группы боковой цепи. Таким образом, остатки аспарагиновой кислоты, серина, цистеина, глутамина, фенилаланина, аспарагина и треонина рацемизируются быстрее, чем другие остатки [78]. Скорость рацемизации зависит также от концентрации гидроксил-ионов (но не от концентрации белка). Следует отметить, что скорость рацемизации у белка примерно в десять раз выше, чем у свободных аминокислот [78], — это позволяет предположить, что у белков межмолекулярные силы уменьшают энергию активации рацемизации. Помимо рацемизации карбанион, образовавшийся в щелочной среде, может подвергаться реакции β-элиминирования с образованием реакционноспособного промежуточного продукта — дегидроаланина. Остатки цистеина и фосфосерина более склонны к реакциям такого типа, чем другие аминокислотные остатки. Именно поэтому в белках после щелочной обработки *D*-цистеин в значительном количестве не обнаруживается.

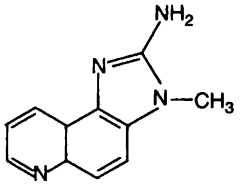


(5.81)

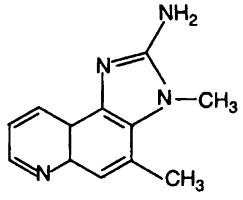
Рацемизация аминокислотных остатков обусловливает снижение усвояемости белка, так как пептидные связи, связывающие *D*-аминокислотные остатки, меньше подвержены гидролизу протеазами желудка и поджелудочной железы. Это приводит к потере подвергшихся рацемизации эссенциальных аминокислот и снижению биологической ценности белка. Кроме того, *D*-аминокислоты хуже всасываются клетками слизистой кишечника и даже после всасывания они не используются в процессе синтезе белка *in vivo*. Некоторые *D*-аминокислоты, в частности *D*-пролин, обладают нейротоксичностью, что было показано на цыплятах [20].

Помимо рацемизации и реакции β-элеиминирования тепловая обработка белков в щелочной среде приводит к разрушению некоторых аминокислотных остатков — аргинина, серина, треонина и лизина (аргинин разлагается до орнитина).

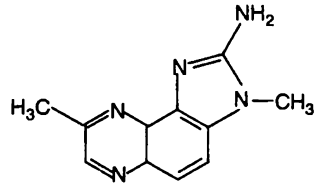
Если нагревать белки до температур выше 200 °С (такие температуры характерны для поверхности пищевых продуктов при жарке, выпекании или при обработке на гриле), то это приводит к разложению и пиролизу аминокислотных остатков. Некоторые продукты пиролиза жареного или жареного на гриле мяса были выделены и идентифицированы, и согласно тесту Эймса (*Ames*)* оказались крайне мутагенными. Наиболее канцерогенные и мутагенные продукты образуются при пиролизе триптофана и глутаминовой кислоты [19]. Пиролиз остатков триптофана приводит к образованию карболинов и их производных. Мутагенные соединения также образуются в мясе при умеренных температурах (190–200 °С) и известны как *IQ* (имидазохинолины). Они представляют собой продукты конденсации креатина, сахаров и некоторых аминокислот (глицина, треонина, аланина и лизина) [60]. Структурные формулы трех наиболее сильных мутагенных соединений в жаренной рыбе приведены ниже.



2-амино-3-метилимидазо-[4,5-*f*]хинолин (*IQ*)



2-амино-3,4-диметилимидазо-[4,5-*f*]хинолин (*MeIQ*)



2-амино-3,8-диметилимидазо-[4,5-*f*]хиноксалин (*MeIQx*)

(5.82)

При рекомендуемых режимах тепловой обработки пищевых продуктов имидазохолиновые соединения обычно присутствуют в очень низких концентрациях (порядка нескольких микрограммов).

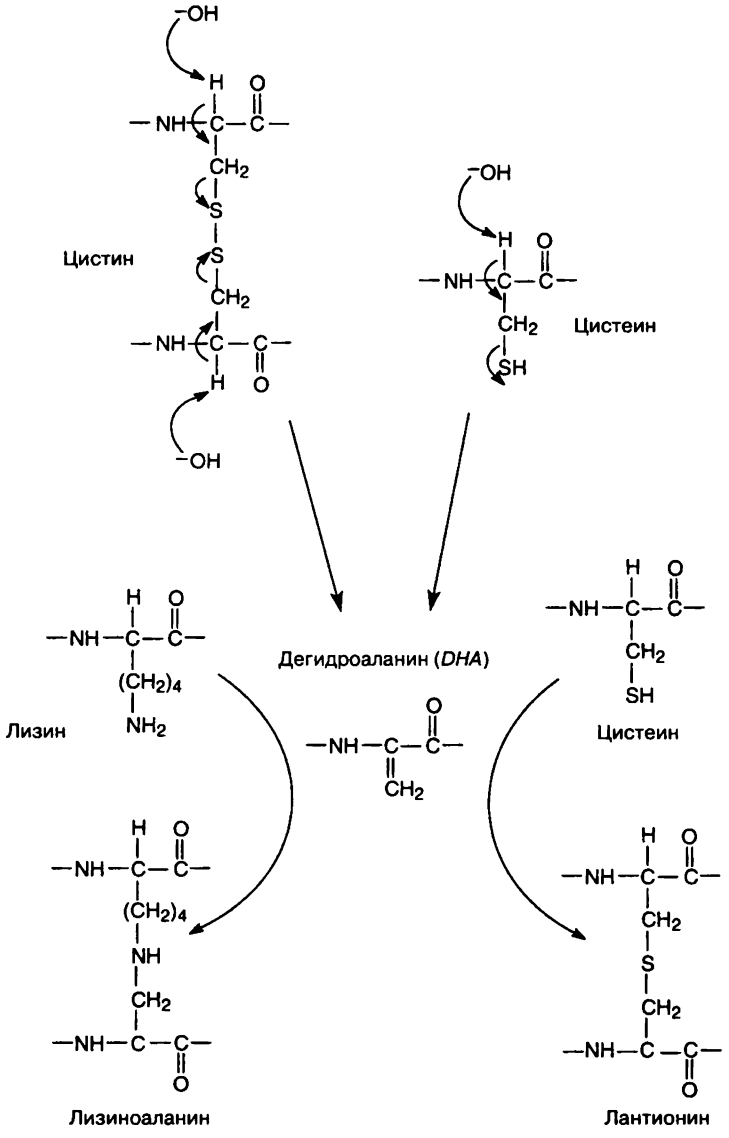
5.8.1.3.2. Поперечная сшивка молекул белков

В некоторых белках пищевых продуктов имеются внутри- и межмолекулярные поперечные сшивки типа дисульфидных мостиков глобулярных белков, а также десмозин-, изодесмозин-, ди- и тритирозин-сшивки в таких волокнистых белках, как кератин, эластин, резилин и коллаген. У коллагена также имеются ε-N-(γ-глутамил)лизил- и/или ε-N-(γ-аспартил)лизил-сшивки. Одна из функций этих сшивок в нативных белках — это минимизация протеолиза *in vivo*. Поперечные сшивки образуются также в ходе переработки пищевых белков, особенно в щелочной среде. Такие неестественные ковалентные связи между полипептидными цепями снижают усвояемость и биодоступность эссенциальных аминокислот, участвующих в сшивке или расположенных вблизи нее.

Как мы уже отмечали в предыдущем разделе, тепловая обработка в щелочной среде или нагревание в нейтральной среде до температур выше 200 °С приводит к захвату протона у α-атома углерода с образованием карбаниона, что приводит к образованию дегидроаланинового (*DHA*) остатка. Синтез *DHA* может также происходить одноступенчато без образования промежуточного продукта — карбаниона. После образования этот *DHA*-остаток, обладающий высокой реакционной способностью, взаимодействует с нуклеофильными группами — ε-аминогруппой лизильного остатка, тиольной группой цистеинового остатка, δ-аминогруппой орнитина (образующейся при разложении аргинина) или гистидиловым остатком, в результате чего в белках происходят соответственно поперечные сшивки лизиноаланина, лантионина, орни-

* Исследование для определения мутагенности веществ. В основе метода лежит детекция мутаций в нескольких бактериальных штаммах. — *Примеч. ред.*

тоаланина и гистидиналанина. Основным видом сшивки в белках после щелочной обработки является лизиноаланиновая, так как количество легкодоступных лизильных остатков довольно велико (формула 5.83).



(5.83)

Образование сшивок между молекулами белков в ходе обработки в щелочной среде снижает их усвояемость и биологическую ценность. Снижение усвояемости обусловлено неспособностью трипсина расщеплять пептидную связь лизиноаланиновой сшивки. Кроме того, накладываемые сшивками стерические ограничения препятствует гидролизу других пептидных связей, «соседствующих» с лизиноаланиновыми и аналогичными сшивками. Имеющиеся данные позволяют предположить, что свободный лизиноаланин всасывается в кишечнике, но не усваивается организмом, и большая часть лизиноаланина выводится с мочой (некоторое количество лизиноаланина метаболизируется в почках). Именно неспособность организма расщеплять лизиноаланиновые ковалентные связи обусловливает снижение биодоступности лизина белков, обработанных в щелочной среде.

У крыс, получавших 100 мг чистого лизиноаланина/кг массы тела или 3000 мг лизиноаланина, связанного с белком, развивалась нефроцитомегалия (почечная недостаточность). Этот нефротоксический эффект у других видов животных (мышей, перепелов, хомяков и обезьян) не наблюдался, что объясня-

ется различиями в метаболизме у крыс по сравнению с другими животными. Очевидно, что обычное содержание поперечных лизиноаланиновых сшивок белков в пищевых продуктах не является для человека нефротоксичным, хотя при обработке белков в щелочной среде желательно минимизировать образование лизиноаланина.

Содержание лизиноаланина в некоторых промышленно выпускаемых пищевых продуктах приведено в табл. 5.24 [120]. Степень образования лизиноаланина обусловлена температурой и значением pH — чем последние выше, тем больше образуется лизиноаланина. Повышение температуры тепловой обработки, таких продуктов, как молоко, приводит к образованию значительного количества лизиноаланина даже при нейтральном значении pH. Образование лизиноаланина можно минимизировать или ингибировать путем внесения низкомолекулярных нуклеофильных соединений (цистеина, аммиака или сульфитов). Эффективность цистеина объясняется тем, что его нуклеофильная SH-группа взаимодействует более чем в 1000 раз быстрее, чем ε-аминогруппа лизина. Сульфат натрия или аммония проявляют свои ингибирующие свойства путем конкурирования за дегидроаланин с ε-аминогруппами лизина. Снижение образования лизиноаланина обусловлено также блокировкой ε-аминогрупп лизиновых остатков еще до обработки белков в щелочных условиях путем реакции с кислотными ангидридами, но это ведет к потере лизина, что может быть неприемлемо в производстве определенных пищевых продуктов.

В нормальных условиях переработки пищевых продуктов образуется очень небольшое количество лизиноаланина. Благодаря этому токсичность лизиноаланина в продуктах после переработки в щелочных условиях большой проблемой не является. Тем не менее, снижение усвояемости и биодоступности лизина, а также рацемизация аминокислот (некоторые из которых токсичны) в таких продуктах, как текстурированные растительные белки, всегда нежелательны.

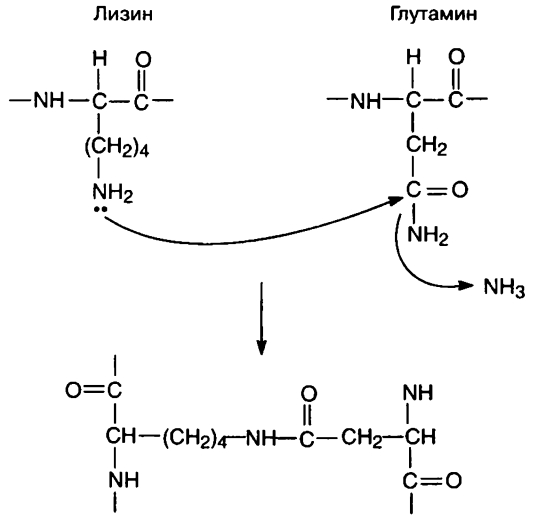
К образованию ε-N-(γ-глутамил)лизиловых и ε-N-(γ-аспартил)лизиновых сшивок приводит также чрезмерная тепловая обработка растворов чистого белка или белковых продуктов с низким содержанием

Таблица 5.24

Содержание лизиноаланина (*LAL*) в некоторых промышленно выпускаемых продуктах. По [120]

Продукт или ингридиент	Содержание лизиноаланина, мкг/г белка
Кукурузные чипсы	390
Претцели	500
Мамалыга (разваренная кукуруза)	560
Тортильи (кукурузные лепешки)	200
Тако (кукурузные лепешки с начинкой)	170
Молоко для детского питания	150–640
Молоко сгущенное без сахара	590–860
Молоко сгущенное с сахаром	360–540
УВТ-молоко	160–370
Молоко кратковременной высокотемпературной пастеризации	260–1030
Сухое молоко распылительной сушки	0
Обезжиренное молоко сгущенное	520
Сырный прдукт (аналог сыра)	1070
Сухой яичный белок	160–1820
Казеинат кальция	370–1000
Казеинат натрия	430–6900
Кислотный казеин	70–190
Гидролизованный растительный белок	40–500
Вещества, облегчающие взбивание	6500–50 000
Изолят соевого белка	0–370
Дрожжевой экстракт	120

углеводов. Эти сшивки участвуют в реакции трансамидирования лизиновых, глутаминовых и аспарагиновых остатков (формула 5.84). Образующиеся сшивки называют изопептидными связями из-за их отсутствия в нативных белках. Изопептиды характеризуются стойкостью к ферментативному гидролизу в кишечнике, и, следовательно, образование изопептидных сшивок снижает усвояемость белков и биодоступность лизина.



(5.84)

Обработка пищевых продуктов ионизирующим излучением приводит к образованию пероксида водорода путем радиолиза воды в присутствии кислорода, что, в свою очередь, вызывает окислительные изменения в белках, а также их полимеризацию. Кроме того, при ионизирующем облучении образуются свободные радикалы (в результате ионизации воды).

$$H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^- \quad (5.85)$$

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + {}^\bullet OH \quad (5.86)$$

Эти гидроксильные свободные радикалы могут инициировать образование белковых свободных радикалов, которые, в свою очередь, приводят к полимеризации белков.

$$P + {}^\bullet OH \rightarrow P^\bullet + H_2O \quad (5.87)$$

$$P^\bullet + P^\bullet \rightarrow P - P$$

$$P^\bullet + P \rightarrow P - P^\bullet \quad (5.88)$$

Тепловая обработка белковых растворов при температуре 70–90 °C при нейтральных значениях pH обычно ведет к сульфогидрильно-дисульфидным обменным взаимодействиям (при наличии этих групп) и полимеризации белков. Тем не менее, образующиеся в результате тепловой обработки такие поперечные сшивки, как правило, не влияют негативно на усвояемость белков и биодоступность эссенциальных аминокислот, так как *in vivo* они разрушаются.

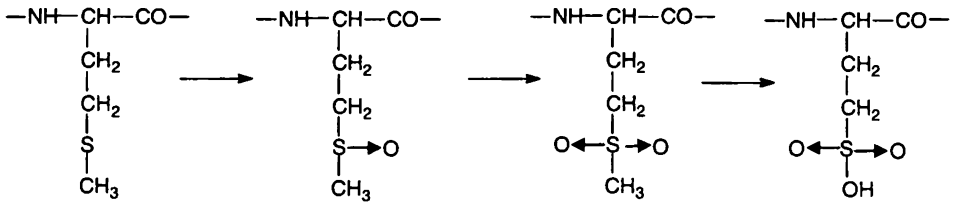
5.8.1.4. Влияние окислителей

Окислители, например, пероксиды водорода или бензоила, применяются в производстве молока в качестве бактерицидных веществ, в производстве муки, изолятов белка и концентратов рыбного белка — как отбеливатель, а при обработке продуктов на основе масличных культур — как детоксиканты. Чаще всего в качестве бактерицидного вещества и детоксиканта в производстве муки применяют гипохлорит натрия.

Помимо окислителей, добавляемых в пищевые продукты, некоторые окислители образуются в продуктах в процессе их переработки — это относится к свободным радикалам, образующимся при обработке пищевых продуктов облучением, при перекисном окислении жиров или при фотоокислении таких соединений, как рибофлавин и хлорофилл, а также в ходе неферментативного окисления. Кроме того, присутствующие в изолятах белка некоторых растений полифенолы могут окисляться в нейтральной среде молекулярным кислородом до хинонов, которые неизбежно преобразуются в пероксиды. Эти вещества с очень высокой реакционной способностью вызывают окисление некоторых аминокислотных остатков и полимеризацию белков. Наиболее подвержены окислению метионин, цистеин, триптофан и гистидин, в несколько меньшей степени — тирозин.

5.8.1.4.1. Окисление метионина

Метионин легко окисляется различными пероксидами до метионина сульфоксида. Термостатирование связанного с белком метионина или свободного метионина с пероксидом водорода при повышенной температуре в течение 30 мин приводит к полному превращению метионина в его сульфоксид [23]. Под действием сильных окислителей сульфоксид метионина подвергается дальнейшему окислению до метионинсульфона, а иногда и до гомоцистеиновой кислоты (формула 5.89).



Метионин Сульфоксид метионина Метионинсульфон Гомоцистеиновая кислота (5.89)

Сразу же после окисления до метионинсульфона или до гомоцистеиновой кислоты метионин становится биологически недоступным. В кислой среде желудка сульфоксид метионина снова превращается в метионин. Существуют данные, что весь сульфоксид метионина при прохождении через кишечник всасывается и превращается *in vivo* в метионин, но медленно. Показатели *PER* и *NPU* у казеина, окисленного 0,1 М пероксидом водорода (который полностью превращает метионин в его сульфоксид), примерно на 10% ниже, чем у контрольного казеина.

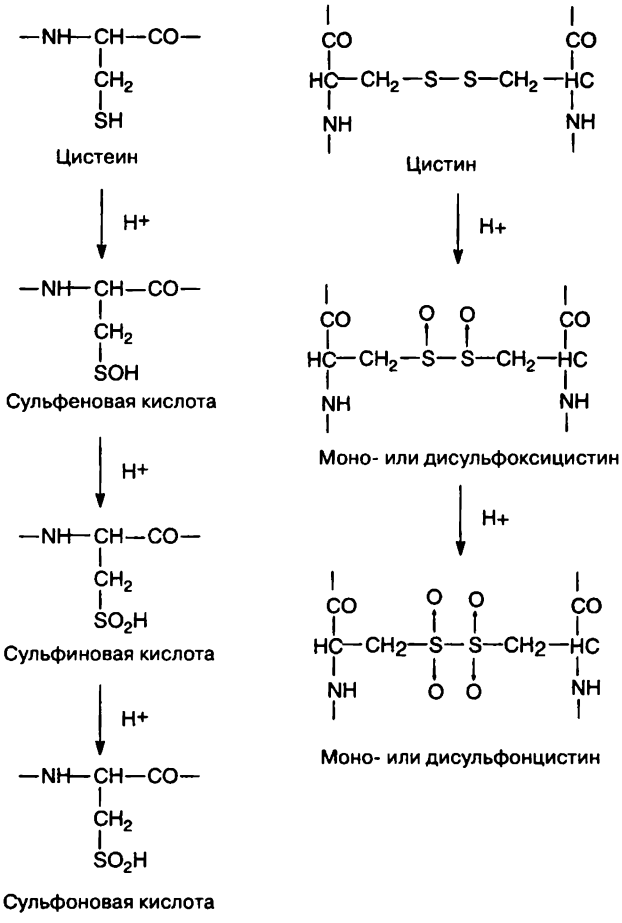
5.8.1.4.2. Окисление цистеина и цистина

В щелочной среде цистеин и цистин по реакции β-элиминирования превращаются в дегидроаланин, однако при окислении цистина и цистеина в простых системах и в кислой среде образуются несколько промежуточных продуктов окисления (формула 5.90), некоторые из которых весьма нестабильны.

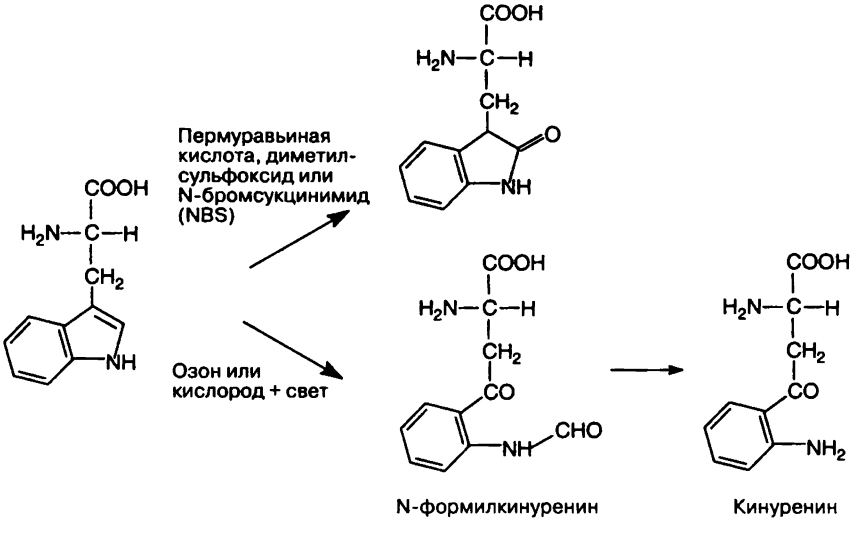
Моно- и дисульфоксиды *L*-цистина биодоступны, предположительно из-за того, что в организме они превращаются обратно в *L*-цистин, тогда как моно- и дисульфоновые производные биологически недоступны. Аналогичным образом сульфеновая кислота цистеина биодоступна, а его сульфиновая и сульфоновая кислоты — биологически недоступны, однако документированных данных о скорости и степени образования этих продуктов окисления в кислых пищевых продуктах еще недостатчоно.

5.8.1.4.3. Окисление триптофана

Среди эссенциальных аминокислот триптофан является своего рода исключением благодаря его разным биологическим функциям, из-за чего стабильности триптофана в процессе переработки пищевых продуктов уделяется большое внимание. В умеренно кислой среде, например, в присутствии пермуравьиной кислоты, диметилсульфоксида или N-бромсукцинимида (*NBS*) триптофан окисляется в основном до β-оксииндолилаланина. В сильнокислой среде, в частности, в присутствии озона, перекиси водорода или пероксидов жиров триптофан окисляется до N-формилкинуренина, кинурина и других (еще не идентифицированных) продуктов (формула 5.91).



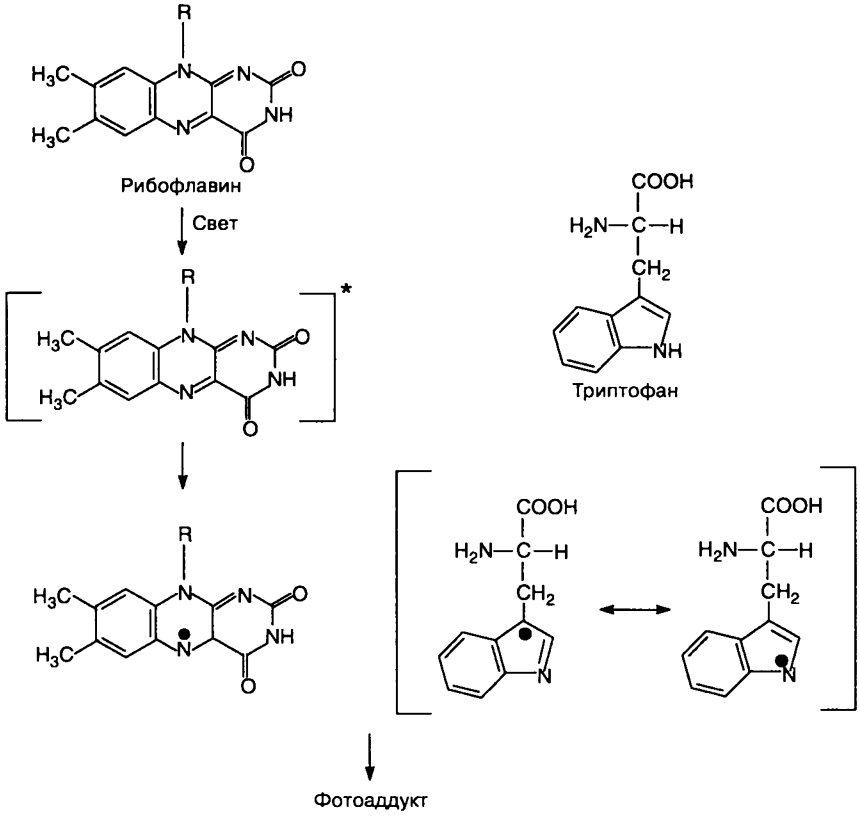
(5.90)



(5.91)

На свету триптофан в присутствии кислорода или фотосенсибилизаторов типа рибофлавина или хлорофилла образует N-формилкинуренин или кинурин (основные продукты), а также некоторых другие минорные продукты реакции. В зависимости от значения pH исходного раствора могут образовываться

и другие производные, в частности, 5-гидроксиформилкинуренин (при pH > 7,0) или трициклический гидропероксид (при pH 3,6–7,1) [86]. Помимо продуктов фотоокисления триптофан при взаимодействии с рибофлавином образует фотоаддукт (формула 5.92). К образованию этого аддукта способен как связанный с белком, так и свободный триптофан. Степень образования фотоаддукта зависит от доступности кислорода, причем в анаэробных условиях она выше [112].



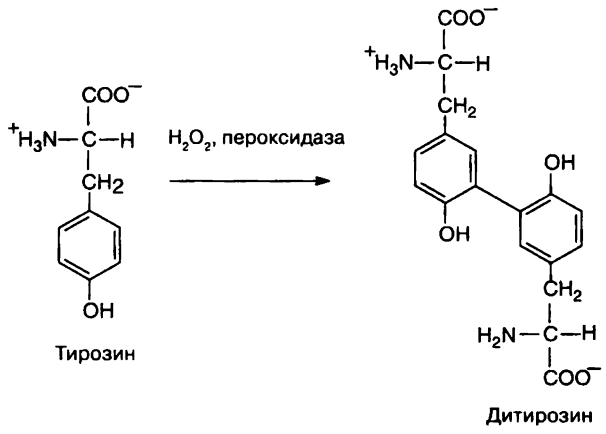
(5.92)

Продукты окисления триптофана биологически активны. Кроме того, кинурины для животных канцерогенны, а все другие продукты фотоокисления триптофана, как и карболины, образующиеся в ходе обжарки мясных продуктов, обладают мутагенной активностью и подавляют рост клеток млекопитающих в тканевых культурах. Фотоаддукт триптофана и рибофлавина обладает цитотоксическим действием на клетки млекопитающих, а при парентеральном питании приводит к дисфункции печени. Все эти нежелательные продукты присутствуют обычно в пищевых продуктах в очень малых концентрациях, если только специально не создается благоприятная для окисления среда.

Среди боковых цепей аминокислотных к фотоокислению чувствительны только боковые цепи цистеина, гистидина, метионина, триптофана и тирозина. У цистеина конечным продуктом является цистеиновая кислота. Метионин сначала окисляется до сульфоксида метионина, а затем превращается в метионинсульфон или гомоцистеиновую кислоту. Фотоокисление гистидина приводит к образованию аспартата и мочевины. Продукты фотоокисления тирозина неизвестны. Поскольку в пищевых продуктах содержится как эндогенный, так и внесенный рибофлавин (витамин B_2), который обычно подвергается действию света и кислорода воздуха, можно ожидать, что вышеуказанные аминокислотные остатки подвргаются определенному фотоокислению. В молоке свободный метионин под действием окисления на свету превращается в метиональ, придающий молоку характерный вкус. В эквимолярных концентрациях скорость окисления серосодержащих аминокислот и триптофана можно выразить следующей последовательностью: метионин > цистеин > триптофан.

5.8.1.4.4. Окисление тирозина

В растворе тирозина под действием пероксидазы или перекиси водорода тирозин окисляется до дитирозина (формула 5.93). Поперечные сшивки выявлены в таких нативных белках, как резилин, эластин, кератин и коллаген, а в последнее время и в различных видах теста.



(5.93)

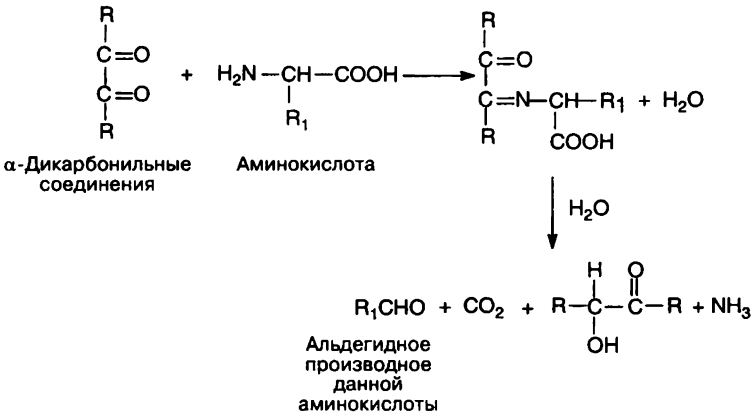
5.8.1.5. Реакции карбонильных соединений с аминами

Среди различных химических превращений белков при переработке пищевых продуктов наибольшее влияние на органолептические и нутритивные свойства имеют реакции неферментативного потемнения Майяра. Эти реакции представляют довольно сложную последовательность реакций, инициированных реакцией между карбонильными соединениями и аминами, в ходе которых при умеренных температурах они разлагаются и в конечном итоге образуют нерастворимый продукт коричневатого цвета — меланоидин (см. главу 14). Реакции Майяра происходят не только в пищевых продуктах при их переработке, но и в биологических системах, где белки и аминокислоты предоставляют аминный компонент, а редуцирующие сахара (альдозы и кетозы), аскорбиновая кислота и образующиеся при окислении жиров карбонильные соединения — карбонильный.

Некоторые карбонильные производные этой последовательности реакций неферментативного потемнения легко вступают в реакцию со свободными аминокислотами, что приводит к разложению аминокислот до альдегидов, аммиака и диоксида углерода (эти реакции называются расщеплением Штрекера), в ходе которого альдегиды придают продукту специфический аромат, поскольку из каждой аминокислоты при расщеплении Штрекера образуется специфический альдегид с характерным запахом (табл. 5.25 и формула 5.94).

Таблица 5.25
Характерный ароматические ноты альдегидов, образующихся из аминокислот в ходе расщепления Штрекера

Аминокислота	Типичный аромат
Phe, Gly	Карамельный
Leu, Arg, His	Аромат хлебной корочки
Ala	Ореховый
Pro	Печеный, запах крекера
Gln, Lys	Сливочного масла
Met	Бульонный, бобовый
Cys, Gly	Дымный, горелый
α-Аминомасляная кислота	Грецкого ореха
Arg	Попкорна



(5.94)

Реакции Майяра снижают биологическую ценность белка. Некоторые продукты этих реакций являются антиоксидантами, а некоторые токсичны, однако концентрация последних в пищевых продуктах не представляет собой фактор риска. Поскольку основным источником первичных аминокислот в белках являются ε-аминогруппы лизина, он часто участвует в карбонильно-аминных реакциях и, как правило, становится в результате биологически недоступным. Потери лизина зависят от стадии реакции неферментативного потемнения. Лизин, участвующий на ранних стадиях этой реакции, включая образование оснований Шиффа, биодоступен. Эти производные ранних стадий гидролизуются в кислой среде желудка до лизина и сахара, однако после стадии образования 1-амино-1-деоксикетозы (кетозамина, продукта перегруппировки Амадори) или 2-амино-2-деокси-*D*-глюкозы (альдозамина, продукта перегруппировки Хейнса) лизин становится биологически не доступным, что объясняется в основном плохим всасыванием этих производных в кишечнике [36]. Здесь важно отметить, что на этой стадии потемнения не происходит. Хотя сульфит ингибирует образование коричневых пигментов [129], он не может предотвратить снижение биодоступности лизина, поскольку не препятствует образованию продуктов перегруппировок Амадори и Хейнса.

Биологическую активность лизина на разных стадиях реакций Майяра можно определить химически путем добавления 1-фтор-2,4-динитробензола (ФДНБ) с последующим кислотным гидролизом белкового производного. ФДНБ вступает в реакцию с доступными ε-аминогруппами лизинового остатка, после чего гидролизат экстрагируют этиловым эфиром в целях удаления непрореагировавшего ФДНБ. Концентрацию ε-динитрофенил-лизина (ε-ДНФ-лизина) в водной фазе определяют по светопоглощению при длине волны 435 нм. Количество доступного лизина можно также определить путем реакции 2,4,6-тринитробензолсульфоновой (ТНБС) кислоты с ε-аминогруппой — в этом случае концентрация ε-тринитрофенил-лизина (ε-ТНФ-лизина) определяется по светопоглощению при длине волны 346 нм.

Реакции неферментативного потемнения приводят не только к потерям лизина: образующиеся химически активные ненасыщенные карбонильные соединения и свободные радикалы вызывают окисление нескольких других эссенциальных аминокислот, особенно *Met, Tyr, His* и *Trp*. Перекрестная сшивка белков образующимися в ходе неферментативного потемнения дикарбонильными соединениями снижает растворимость белков и ухудшает их усвояемость.

Некоторые продукты реакции Майяра считаются мутагенными, и хотя мутагены совсем не обязательно обладают канцерогенными свойствами, все известные канцерогены мутагенны. Из этого следует, что образование в пищевых продуктах мутагенных соединений-продуктов реакции Майяра должно вызывать озабоченность. Исследование смесей глюкозы и аминокислот показало, что по результатам теста Эймса лизиновые и цистеиновые продукты реакции Майяра мутагенны, а *Trp-, Tyr-, Asp-, Asn-* и *Glu*-продукты таковыми не являются. Следует отметить, что при пиролизе *Trp-* и *Glu*-продукты в обычном жареном и жаренном на гриле мясе также мутагенны. Как мы уже отмечали, при тепловой обработке сахаров и аминокислот в присутствии креатина образуются наиболее мутагенные продукты *IQ*-типа (см. уравнение 5.82). Хотя результаты исследования модельных систем и нельзя напрямую переносить на реальные пищевые продукты, вполне возможно, что взаимодействие продуктов реакции Майяра с другими низкомолеку-

лярными пищевыми компонентами может привести к образованию мутагенных и/или канцерогенных соединений.

С другой стороны, некоторые продукты реакции Майяра (особенно редуктоны) обладают антиоксидантной активностью [88], обусловленной их редуцирующими свойствами и способностью к образованию хелатных комплексов с металлами-прооксидантами (медью и железом). Эти аминные редуктоны, образующиеся при реакции триозы с аминокислотами *Gly, Met* и *Val,* обладают очень высокой антиоксидантной активностью.

Помимо редуцирующих сахаров в реакциях карбонильных соединений с аминами участвуют и другие альдегиды и кетоны, присутствующие в пищевых продуктах. С аминогруппами белков реагируют прежде всего госсипол (из хлопковых семян), глютаральдегид (добавляемый к белковым кормам для регулирования дезаминирования в рубце жвачных животных) и альдегиды (особенно малоновый), образующиеся при окислении жиров. Бифункциональные альдегиды типа малонового могут сшивать и полимеризовать белки, что приводит к нерастворимости, ухудшению усвояемости и биодоступности лизина, а также ухудшению функциональных свойств белков (формула 5.95). С ε-аминогруппой лизинового остатка реагирует также формальдегид; считается, что увеличение жесткости мышечной ткани тресковых рыб при хранении в замороженном состоянии обусловлено именно реакцией формальдегида с мышечными белками.

$$\underset{\text{Аминогруппа белка}}{P{-}NH_2} + \underset{\text{Малоновый альдегид}}{OHC{-}CH_2{-}CHO} \rightarrow \underset{\text{Перекрестная сшивка «белок–белок»}}{P{-}N{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}N{-}P} \qquad (5.95)$$

5.8.1.6. Прочие реакции пищевых белков

5.8.1.6.1. Реакции с липидами

При окислении ненасыщенных жирных кислот образуются алкоксильные и пероксильные свободные радикалы, которые, в свою очередь, при реакции с белками образуют свободные радикалы «липид-белок». Такие конъюгированные (сопряженные) свободные радикалы могут подвергаться полимеризационной перекрестной сшивке белков с образованием различных продуктов:

$$LH + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet} \qquad (5.96)$$

$$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow LOOH + L^{\bullet} \qquad (5.97)$$

$$LOOH \rightarrow LO^{\bullet} + HO^{\bullet} \qquad (5.98)$$

$$LO^{\bullet} + PH \rightarrow LOP \qquad (5.99)$$

$$LOP + LO^{\bullet} \rightarrow {}^{\bullet}LOP + LOH \qquad (5.100)$$

$${}^{\bullet}LOP + {}^{\bullet}LOP \rightarrow POLLOP \qquad (5.101)$$

или

$$LOO^{\bullet} + PH \rightarrow LOOP \qquad (5.102)$$

$$LOOP + LOO^{\bullet} \rightarrow {}^{\bullet}LOOP + LOOH \qquad (5.103)$$

$${}^{\bullet}LOOP + {}^{\bullet}LOOP \rightarrow POOLLOOP \qquad (5.104)$$

$${}^{\bullet}LOOP + +{}^{\bullet}LOP \rightarrow POLLOOP. \qquad (5.105)$$

Кроме того, свободные радикалы липидов могут также индуцировать образование свободных радикалов белков в боковых цепях цистеина и гистидина, которые также могут подвергаться сшивке и полимеризации.

$$LOO^{\bullet} + PH \rightarrow LOOH + P^{\bullet} \quad (5.106)$$

$$LO^{\bullet} + PH \rightarrow LOH + P^{\bullet} \quad (5.107)$$

$$P^{\bullet} + P^{\bullet} \rightarrow P{-}P^{\bullet} \quad (5.108)$$

$$P{-}P^{\bullet} + PH \rightarrow P{-}P{-}P^{\bullet} \quad (5.109)$$

$$P{-}P{-}P^{\bullet} + P^{\bullet} \rightarrow P{-}P{-}P{-}P \quad (5.110)$$

Липидные гидропероксиды (LOOH) в пищевых продуктах могут расщепляться с высвобождением альдегидов и кетонов, прежде всего малонового альдегида. Эти карбонильные соединения вступают в реакцию с аминогруппами белков посредством карбонильно-аминных реакций с образованием оснований Шиффа. Как мы уже отмечали, при реакции малонового альдегида с лизильными боковыми цепями происходит сшивка и полимеризация белков. Эта реакция липидных пероксидов с белками обычно негативно влияет на нутритивные свойства белков, а нековалентная сшивка карбонильных соединений с белками приводит к образованию побочных привкусов и запахов.

5.8.1.6.2. Реакции с полифенолами

В растительных тканях присутствуют такие фенольные соединения, как *p*-гидроксибензойная кислота, катехол (пирокатехин), каффеиновая кислота, госсипол и кверцетин. При мацерации (вымачивании) растительных тканей при щелочном значении pH эти фенольные соединения окисляются молекулярным кислородом до хинонов. К тому же результату приводит действие полифенолоксидазы растительных тканей. Эти обладающие высокой реакционной способностью хиноны необратимо реагируют с белковыми сульфгидрильными и аминными группами. Реакции хинонов с SH- и α-аминогруппами (на N-конце) протекает намного быстрее, чем с ε-аминогруппами. Кроме того, хиноны подвержены также реакциям конденсации, приводящими к образованию высокомолекулярных коричневых пигментов, которые обладают высокой реакционной способностью и легко соединяются с SH- и аминогруппами белков. Реакции между хинонами и аминогруппами снижают усвояемость и биодоступность связанных с белком лизина и цистеина.

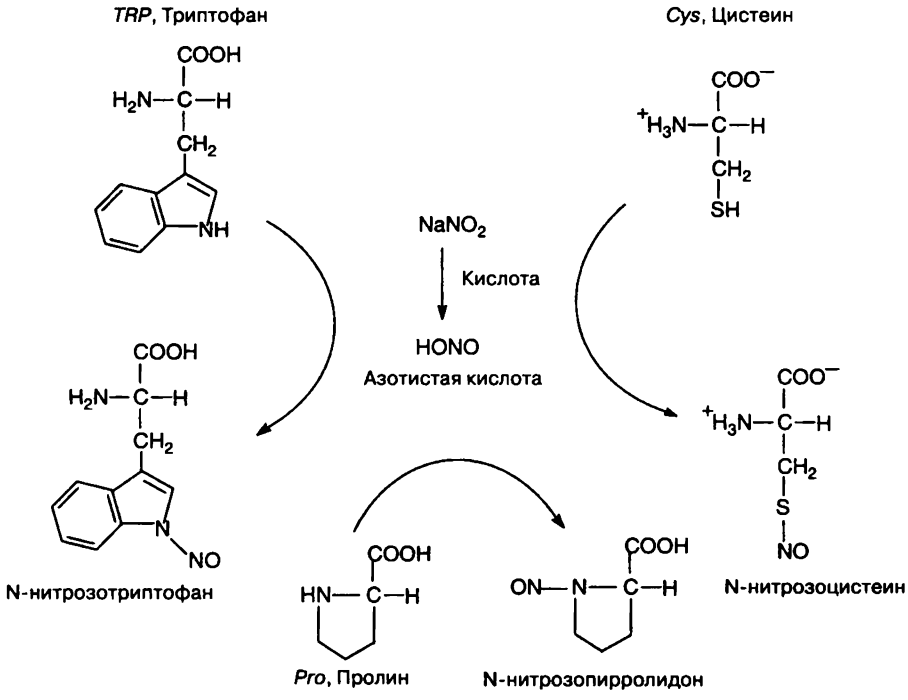
5.8.1.6.3. Реакции с галогенированными растворителями

Галогенированные органические растворители зачастую применяются для экстрагирования из семян масличных культур (сои и хлопка) масел и некоторых антиалиментарных соединений. При экстракции трихлорэтиленом образуется небольшое количество токсичного S-дихлорвинил-*L*-цистеина. С другой стороны, растворители типа дихлорметана и тетрахлорэтилена с белками не реагируют. 1,2-Дихлорэтан реагирует с *Cys*-, *His*- и *Met*-остатками белков. Некоторые фумиганты (например, метилбромид) алкилируют *Lys*-, *His*-, *Cys*- и *Met*-остатки. Все эти реакции снижают биологическую ценность белков, причем на некоторые из них следует обращать внимание с точки зрения безопасности пищевых продуктов для здоровья.

5.8.1.6.4. Реакции с нитритами

При реакции нитритов со вторичными аминами и (в некоторой степени) с первичными и третичными аминами образуются N-нитрозамины, являющиеся в пищевых продуктах одними из наиболее канцерогенных соединений. Нитриты обычно вносят в мясные продукты для улучшения их цвета и предотвращения роста и размножения бактерий. К участвующим в этой реакции аминокислотам (или аминокислотным остаткам) относятся прежде всего *Pro, His* и *Trp*, но с нитритами могут реагировать также *Arg*, *Tyr* и *Cys*. Данные реакции (формула 5.111) происходят в основном в кислой среде и при повышенных температурах.

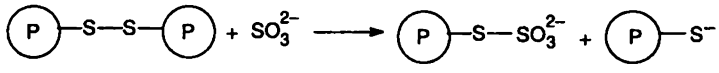
С нитритами также могут реагировать вторичные амины — продукты перегруппировок Амадори и Хейнса, образовавшиеся в ходе реакции Майяра. Особое внимание уделяется образованию N-нитрозаминов при тепловой обработке (варке, жарке и жарке мяса на гриле), причем минимизации содержания N-нитрозаминов способствует внесение аскорбиновой кислоты или эриторбата натрия.



(5.111)

5.8.1.6.5. Реакции с сульфитами

Сульфиты редуцируют дисульфидные связи в белках с образованием S-сульфонатных производных (формула 5.112). С цистеиновыми остатками они не реагируют.



(5.112)

В присутствии редуцирующих соединений (цистеина или меркаптоэтанола) эти S-сульфонатные производные преобразуются обратно в цистеиновые остатки. S-сульфонаты разлагаются в кислой (как в желудке) и щелочной средах до дисульфидов. Биодоступность цистеина при S-сульфонизации не снижается. Увеличение при S-сульфонизации отрицательного электрического заряда и разрушение дисульфидных мостиков в белках приводит к раскручиванию молекул белков, что влияет на их функциональные свойства.

5.8.2. Изменения функциональных свойств белков

На функциональные свойства белков могут влиять способы и технологии их изоляции (выделения). Небольшая степень денатурации белков на различных стадиях их выделения обычно бывает желательна, поскольку тем самым поддерживается приемлемая растворимость белка, зачастую необходимая для обеспечения его функциональных свойств. В некоторых случаях контролируемая или частичная денатурация белков может улучшать те или иные функциональные свойства.

Белки зачастую выделяют методом изоэлектрического осаждения. Вторичные, третичные и четвертичные структуры большинства глобулярных белков в изоэлектрической точке стабильны, и при диспергировании при нейтральном значении pH белки снова становятся растворимыми. С другой стороны, пустоты в белках (типа казеиновых мицелл) при изоэлектрическом осаждении необратимо дестабилизируются. Сжатие (коллапс) мицеллярной структуры казеина при изоэлектрическом осаждении обусловлено несколькими факторами, в том числе солюбилизацией коллоидного фосфата кальция и изменением равновесия между гидрофобным и электростатическим взаимодействием различных типов казеина. Состав изоэлектрически осажденных белков обычно различается от состава исходного белка. Это объясняется тем, что минорные белковые фракции в изоэлектрической для основного компонента точке растворимы

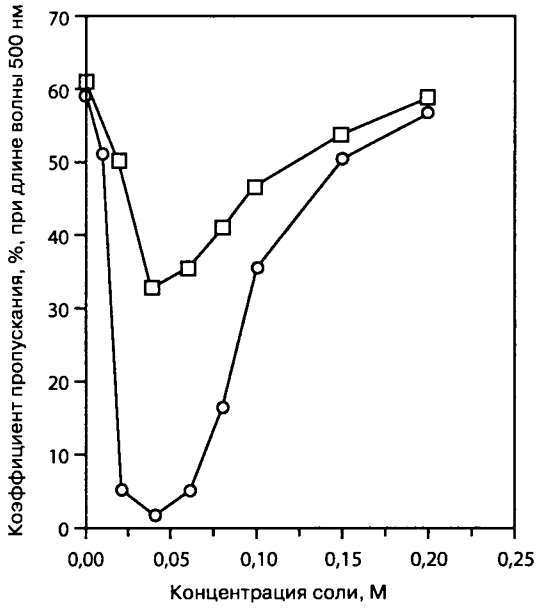


Рис. 5.34. График зависимость мутности 5%-ного изолята сывороточного белка от концентрации соли в растворах $CaCl_2$ (о) и $MgCl_2$ (□) после суточной выдержки при комнатной температуре. По [135]

и, следовательно, не выпадают в осадок. Такое изменение в составе белка влияет на функциональные свойства белкового изолята.

Для получения концентратов сывороточного белка (КСБ или КБС) широко применяют ультрафильтрацию, в ходе которой удаление мелких растворенных примесей влияет как на белковый, так и на небелковый состав КСБ. Частичное удаление лактозы и золы существенно меняет функциональные свойства КСБ. Более того, при выдерживании ультрафильтрованного концентрата при температуре 50–55 °С усиливаются взаимодействия «белок–белок», из-за чего снижается растворимость и стабильность ультрафильтрованного белка, что, в свою очередь, меняет его влагосвязывающую способность (ВСС), геле- и пенообразующие, а также эмульгирующие свойства. Что касается зольности, то различия в содержании кальция и фосфатов существенно меняет гелеобразующие свойства КСБ. У изолятов сывороточного белка (ИСБ), полученных методом ионного обмена, зольность очень мала, благодаря чему их функциональные свойства лучше, чем у изолятов, полученных методами ультра- или диафильтрации.

Зачастую агрегация белка индуцируется ионами кальция благодаря образованию ионных связей между ионами Ca^{2+} и карбоксильными группами. Степень агрегации зависит от концентрации ионов кальция. У большинства белков максимальная агрегация наблюдается при концентрации Ca^{2+} 40–50 М. У некоторых белков, в частности у казеина и соевого белка, агрегация под действием кальция приводит к осаждению, а при работе с сывороточным изолятом образуются стойкие коллоидные формы агрегатов (рис. 5.34).

Выдержка белков при щелочных значениях pH, особенно при повышенных температурах, приводит к необратимым конформационным изменениям, вызываемым частично дезамидированием *Asn*- и *Gln*-остатков, а также β-элиминированием цистиновых остатков. Увеличение общего отрицательного электрического заряда и разрушение дисульфидных мостиков приводят к значительным структурным изменениям белков, подвергаемых действию щелочей. Как правило, растворимость белков после щелочной обработки повышается, у них улучшаются пенообразующие и эмульгирующие свойства.

Для экстрагирования соевого и хлопкового масел часто применяют гексан. Такая обработка неибежно приводит к денатурации пищевых белков, а значит, и влияет на их растворимость и другие функциональные свойства.

Влияние тепловой обработки на химические и функциональные свойства белков мы рассматривали в разделе 5.6. Разрыв пептидных связей, в том числе с аспартиловыми остатками, при жестких режимах тепловой обработки белковых растворов высвобождает низкомолекулярные пептиды, причем такая обработка в условиях щелочного и кислого pH приводит также к частичному гидролизу белков. Количество низкомолекулярных пептидов в изолятах белка может изменить их функциональные свойства.

5.9. Химические и ферментативные модификации белков

5.9.1. Химические модификации

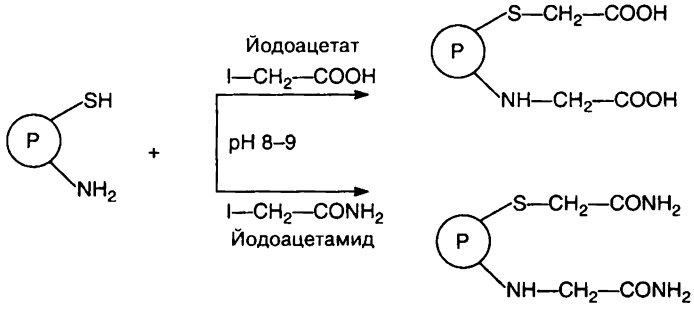
В первичной структуре белков присутствуют несколько реакционноспособных боковых цепей. Физико-химические свойства белков можно изменить и улушить их функциональные свойства путем химической модификации боковых цепей. Следует, однако, иметь в виду, что хотя химическая модификация аминокислотной боковой цепи может улучшить функциональные свойства белков, но при этом может снизиться их биологическая ценность, могут образоваться некоторые токсичные аминокислотные производные

и возникнуть проблемы с соблюдением нормативно-регламентирующих актов, хотя аналогичные реакции происходят и *in vivo*, и *in situ*.

Поскольку у белков имеются несколько реационноспособных боковых цепей, может происходить множество химических реакций. Некоторые такие реакции приведены в табл. 5.5, однако для модификации белков подходят лишь немногие из них. Наиболее реакционноспособными нуклеофильными группами белков являются ε-аминогруппа лизильного остатка и SH-группа цистеина. Большинство химических модификаций белков проводят с участием именно этих групп.

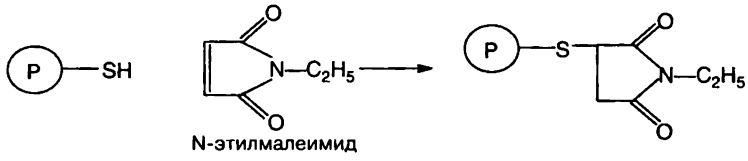
5.9.1.1. Алкилирование

SH- и аминогруппы можно алкилировать йодоацетатом или йодоацетамидом. Реакция с иодоацетатом приводит к удалению положительного заряда с лизильного остатка и образованию у лизильного и цистеинового остатков отрицательного заряда (формула 5.113).



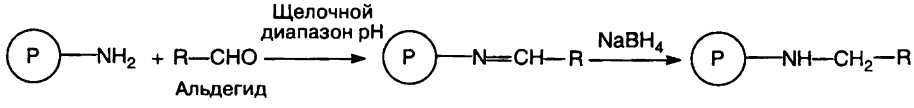
(5.113)

Увеличение суммарного отрицательного заряда белков может изменить зависимость «pH–растворимость» и привести к раскручиванию молекулы белка. Реакция с йодоацетамидом приводит только к удалению положительного заряда, что вызывает локальное увеличение отрицательного заряда, однако количество отрицательно заряженных групп останется неизменным. Реакция с йодоацетамидом эффективно блокирует сульфгидрильные группы, благодая чему полимеризации, инициированной дисульфидными группами, не происходит. Сульфгидрильные группы блокируются также N-этилмалеимидом:



(5.114)

Аминогруппы могут также редуктивно алкилироваться альдегидами и кетонами в присутствии таких восстановителей, как борогидрид натрия ($NaBH_4$) или цианоборогидрид натрия ($NaCNBH_3$). В этом случае основания Шиффа, образовавшиеся в ходе реакции карбонильных и аминогрупп, последовательно редуцируются данным восстановителем. В этой реакции могут также использоваться алифатические альдегиды и кетоны, а также редуцирующие сахара. Редуцирование оснований Шиффа предотвращает протекание реакции Майяра, и в качестве конечного продукта реакции образуется гликопротеин:



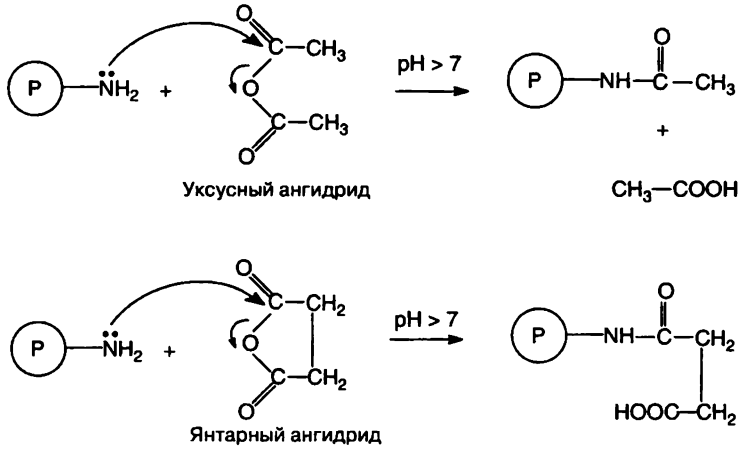
(5.115)

Физико-химические свойства модифицированного белка обусловлены используемыми реагентами. Гидрофобность белка можно повысить выбором алифатического альдегида или кетона, а путем изменения длины цепи алифатической группы можно изменить степень гидрофобности. С другой стороны, если

использовать редуцирующий сахар, то полученный белок будет более гидрофильным. Поскольку гликопротеины обладают более высокими эмульгирующими и пенообразующими свойствами (ср. овальбумин), редуктивное гликозилирование белков должно повышать растворимость и улучшать свойства белков.

5.9.1.2. Ацилирование

Аминогруппы ацилируются при реакции с различными кислотными ангидридами, наиболее распространенными из которых являются уксусный и янтарный ангидриды. Реакция белка с уксусным ангидридом приводят к устранению положительного заряда у лизильного остатка и соответствующему увеличению общего отрицательного заряда молекулы. Ацилирование янтарным или другим дикарбоксильным ангидридом приводит к замене положительного заряда лизильного остатка на отрицательный, что также приводит к увеличению суммарного отрицательного заряда молекулы данного белка и к ее раскручиванию при экстенсивной реакции.



(5.116)

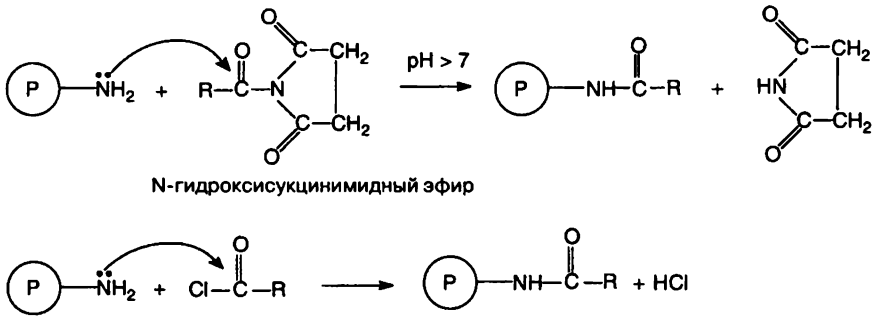
Ацилированные белки обычно более растворимы, чем нативные, и растворимость казеина и других малорастворимых белков можно повысить путем их ацилирования янтарным ангидридом. Вместе с тем ход этой реакции определяется степенью модификации белка и, как правило, его функциональными свойствами. Так, сукцинированные белки характеризуются плохими гелеобразующими свойствами при нагревании из-за сильных сил электростатического отталкивания. Высокое сродство к воде сукцинированных белков снижает их адсорбционную способность на границах раздела фаз «масло–вода» и «воздух–вода», из-за чего ухудшаются пенообразующие и эмульгирующие свойства. Кроме того, при введении нескольких карбоксильных групп сукцинированные белки по сравнению с нативными менее стойки к действию кальция, внесение которого вызывает осаждение.

Реакции ацетилирования и сукцинирования необратимы. Изопепетидные связи «сукцинил–лизин» устойчивы к реакциям расщепления, катализируемым панкреатическими ферментами, и, следовательно, слизистая кишечника плохо всасывает соединения с этими сукцинильно-лизиновыми связями. Из-за этого реакции сукцинирования и ацетилирования существенно снижают биологическую ценность белков.

Присоединение к ε-аминогруппе лизильного остатка высокомолекулярных жирных кислот может повышать амфифильность белков. Это достигается путем реакции белка с жирнокислотными алкилхлоридом или N-гидроксисукцинимидным эфиром (формула 5.117). Такая модификация повышает липофильность и способность белка связываться с жирами; кроме того облегчается формирование новой мицеллярной структуры и других типов белковых агрегатов.

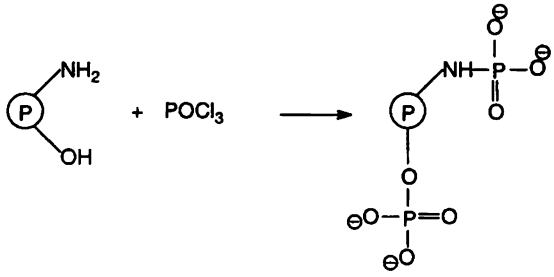
5.9.1.3. Фосфорилирование

Некоторые белки натуральных пищевых продуктов, в частности казеины, представляют собой фосфопротеины. Такие фосфорилированные белки очень чувствительны к коагуляции под действием ионов кальция, что может быть желательно в производстве продуктов, подобных аналогам сыров. Белки можно



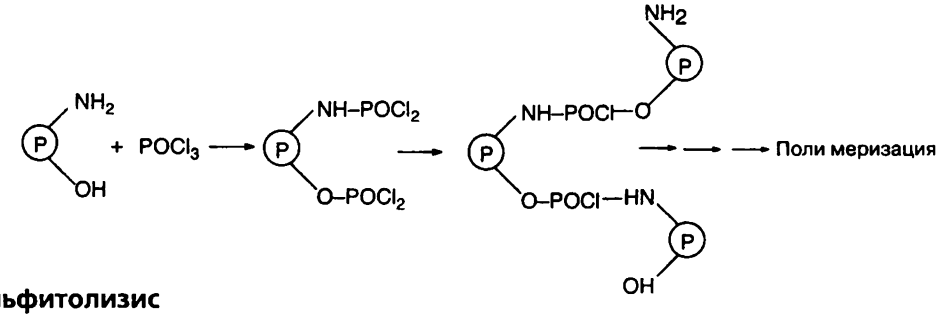
(5.117)

фосфорилировать путем их реакции с оксихлоридом фосфора $POCl_3$ (формула 5.118). Фосфорилируются в основном гидроксильные группы сериновых и треониниовых остатков, а также аминогруппы лизильного остатка, при этом существенно возрастает общий отрицательный электрический заряд молекулы белка.



(5.118)

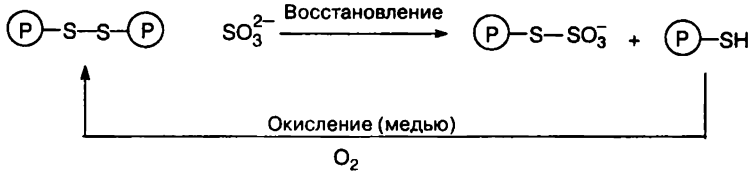
При фосфорилировании аминогрупп на каждый положительный заряд, удаленный при модификации, приходится два добавленных отрицательных заряда. При определенных условиях, особенно при высокой концентрации белка, фосфорилирование с участием $POCl_3$ может привести к полимеризации белков (формула 5.119). Такие реакции полимеризации минимизируют повышение общего отрицательного заряда и чувствительности модифицированных белков к действию ионов кальция. Связь N—P лабильна к действию кислот, из-за чего в кислых условиях желудка N-фосфорилированные белки подвергаются реакции дефосфорилирования, и лизильные остатки регенерируются. Благодаря этому усвояемость лизина при фосфорилировании существенно не снижается.



(5.119)

5.9.1.4. Сульфитолизис

Сульфитолизис — это преобразование дисульфидных мостиков белков в S-сульфонатные производные с помощью окислительно-восстановительных систем, а именно сульфита и двухвалентной меди, а также других окислителей (формула 5.120).



(5.120)

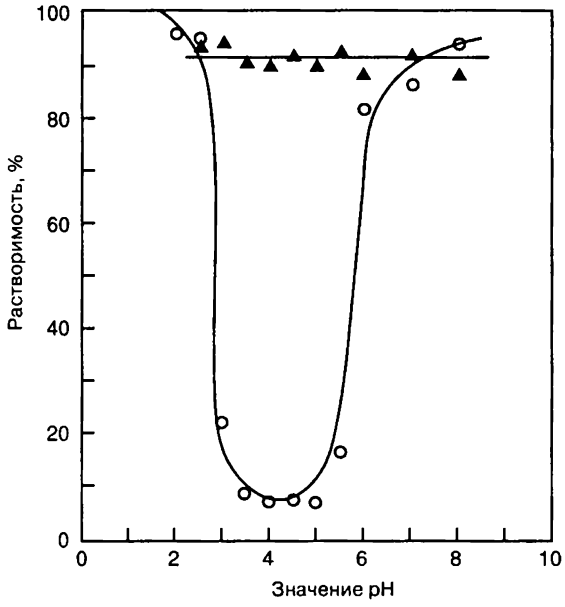


Рис. 5.35. Зависимость растворимости белков от значения pH: ▲ — сырая сладкая подсырная сыворотка; о — сульфонированная сладкая сыворотка. По [48]

Добавление к белку сульфита сначала расщепляет дисульфидные мостики с образованием одной S—SO^-_3-группы и одной свободной тиоловой группы. Это реакция обратима, и константа равновесного состояния мала. В присутствии окислителей типа двухвалентной меди высвободившиеся SH-группы снова окисляются с образованием внутри- или межмолекулярных дисульфидных мостиков, которые, в свою очередь, снова расщепляются сульфитными ионами. Этот окислительно-восстановительный цикл повторяется до тех пор, пока все дисульфидные связи и сульфгидрильные группы не превратятся в S-сульфонатные производные [49].

И расщепление дисульфидных связей, и включение SO^-_3-групп приводит к конформационным изменениям белков, влияющим на их функциональные свойства. Так, сульфитолизис белков в подсырной сыворотке существенно меняет белковый профиль «значение pH—растворимость» (рис. 5.35) [48].

5.9.1.5. Этерификация

Карбоксильные группы *Asp*- и *Glu*-остатков не обладают высокой реакционной способностью, однако в кислой среде эти остатки могут этерифицироваться спиртом. Получающиеся эфиры стабильны в кислом диапазоне значений pH, но в щелочном диапазоне они быстро гидролизуются.

5.9.2. Ферментативная модификация белков

Известно, что в биологических системах происходят определенные ферментативные модификации белков, которые можно разделить на шесть типов: гликозилирование, гидроксилирование, фосфорилирование, метилирование, ацилирование и перекрестная сшивка. Для улучшения функциональных свойств можно использовать ферментативную модификацию *in vitro*, но практическое значение для пищевых белков имеют лишь некоторые из указанных типов.

5.9.2.1. Ферментативный гидролиз

Гидролиз пищевых белков протеазами (пепсином, трипсином, химотрипсином, папаином и термолизином) изменяет их функциональные свойства. Экстенсивный гидролиз неспецифичными протеазами, например папаином, приводит к солюбилизации даже малорастворимых белков. В подобных гидролизатах обычно содержатся низкомолекулярные пептиды (с двумя–четырьмя аминокислотными остатками). Экстенсивный гидролиз ухудшает некоторые функциональные свойства, в частности, геле-, пенообразующие и эмульгирующие (см. раздел 5.6).

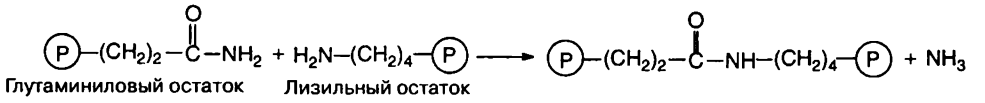
5.9.2.2. Пластеиновая реакция

Пластеиновой реакцией называют ряд реакций, включающих первоначальный протеолизис с последующим повторным синтезом пептидных связей некоторой протеазой (обычно папаином и химотрипсином). Белковый субстрат в низкой концентрации первоначально гидролизуется папаином. При концентрировании содержащего фермент гидролизата до содержания СВ 30–35% и инкубировании ферменты случайным образом рекомбинируют пептиды с образованием новых пептидных связей. Пластеиновая реакция может происходить и в одну стадию, когда 30–35%-ный белковый раствор (или паста) инкубируется с папаином в присутствии *L*-цистеина [131]. В обоих случаях молекулярная масса образующихся поли-

пептидов обычно меньше, чем у исходного белка. Тем самым фермент, особенно папаин и химотрипсин, в определнных условиях действуют одновременно и как протеаза, и как эстераза. Поскольку структура и аминокислотная последовательность продуктов пластеиновой реакции отличаются от структуры и последовательности исходного белка, у них зачастую иные функциональные свойства. При включении в реакционную смесь *L*-метионина он ковалентно связывается с вновь образованными полипептидами. Пластеиновую реакцию можно использовать для улучшения биологической ценности пищевых белков с дефицитом метионина или лизина.

5.9.2.3. Перекрестная сшивка белков

Трансглутаминаза катализирует реакции переноса ацильного остатка, в том числе реакции между ε-аминогруппой лизильных остатков (акцептора ацила) и амидной группы глутаминовых остатков (донора ацила) с образованием изопептидной сшивки (формула 5.121).



(5.121)

Эту реакцию можно использоваться для перекрестной сшивки различных белков и получения их новых форм с улучшенными функциональными свойствами. При высокой концентрации белка такая катализируемая трансглутаминазой сшивка приводит к образованию белковых гелей и пленок при комнатной температуре [85, 90, 91]. Эту реакцию можно также использовать для улучшения нутритивного качества белков путем перекрестной сшивки лизина и/или метионина через глутаминовые остатки (см. табл. 5.23) [58].

Дополнительная литература

Bodwell C. E., Adkins J. S., Hopkins D. T. (eds.). *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation.* — Westport, Connecticut: AVI Publishing Co., 1981.

Ghelis C., Yon J. *Protein Folding.* — NY: Academic Press, 1982.

Hettiarachchy N. S., Ziegler G. R. (eds.). *Protein Functionality in Food Systems.* — NY: Marcel Dekker, 1994.

Kinsella J. E., Soucie W. G. (eds.)/ *Food Proteins.* — Champaign, Illinois: American Oil Chemists' Society, 1989.

Mitchell J. R., Ledward D. A. (eds.). *Functional Properties of Food Macromolecules.* — NY: Elsevier Applied Sci., 1986.

Parris N., Barford R.. *Interactions of Food Proteins.* — Washington, DC: American Chemical Society, ACS Symposium Series 454, 1991.

Phillips R. D., Finley J. W. (eds.). *Protein Quality and the Effects of Processing.* — NY: Marcel Dekker, 1989.

Schulz G. E., Schirmer R. H. *Principles of Protein Structure.* — NY: Springer-Verlag, 1980.

Whitaker J. R. Tannenbaum S. R. *Food Proteins.* — Westport, Connecticut: AVI Publishing Co., 1977.

Whitaker J. R., Fujimaki M. (eds.). *Chemical Deterioration of Proteins.* — Washington, DC: Amercian Chemical Society, ACS Symposium Series, 1980.

Литература

1. Aas K. The biochemistry of food allergens: what is essential for future research? // *Food Allergy* / E. Schmidt, D. Reinhardt, eds. — NY: Raven Press, Ltd., 1988. — P. 1.
2. Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid // *J. Agric. Food Chem.,* 1979, 27, p. 1256–1260.
3. Adler-Nissen J. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures // *Protein Tailoring for Food and Medical Uses* / Feeney R. E., Whitaker J. R., eds. — NY: Marcel Dekker, 1986. — P. 97–122.
4. Aguilar C. F., Sanderson L., Moracci M., Ciaramella M., Nucci R., Rossi M., Pearl L. Crystal structure of the β-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus* // *J. Mol. Biol.,* 1997, 271, p. 789–802.
5. Ahren T. J., Klibanov A. M. The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100 °C // *Science,* 1985, 228, p. 1280–1284.
6. Anand K., Damodaran S. Dynamics of exchange between α_{s1}-casein and β-casein during adsorption at air-water interface // *J. Agric. Food Chem.,* 1996, 44, p. 1022–1028.
7. Angsupanich K., Edde M., Ledward D. A. Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle // *J. Agric. Food Chem.,* 1999, 47, p. 92–99.
8. Arakawa T., Timasheff S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding // *Biochemistry,* 1984, 23, p. 5912–5923.

9. Asakura T., Adachi K., Schwartz E. Stabilizing effect of various organic solvents on protein // *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, p. 6423–6425.
10. Barro R., Rooke L., Bekes R., Gras P., Tatham A. S., Fido R., Lazzeri P. A., Shewry P. R., Barcelo P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties // *Nat. Biotechnol.* 1997, 15, p. 1295–1299.
11. Bigelow C. C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure // *J. Theor. Biol.*, 1967, 16, p. 187–211.
12. Bock A., Forchhammer K., Heider J., Baron C. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code // *Trends Biochem. Sci.*, 1991, 16, p. 463–4167.
13. Brems D. N. Folding of bovine growth hormone // *Protein Folding* / L. M. Gierasch, J. King, eds. — Washington, DC: American Association for the Advancement of Science, 1990. — P. 133.
14. Bull H. B., Breese K. Thermal stability of proteins // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 158, p. 681–686.
15. Bushuk W., MacRitchie F. Wheat proteins: aspects of structure that determine breadmaking quality // *Protein Quality and the Effects of Processing* / R. Dixon Phillips, J. W. Finley, eds.. — NY: Marcel Dekker, Inc., 1989. — P. 345–369.
16. Caldarelli G., De Los Rios P. Cold and warm denaturation of proteins // *J. Biol. Phy.*, 2001, 27, p. 229–241.
17. Cameron D. R., Weber M. E., Idziak E. S., Neufeld R. J., Cooper D. G. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index // *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, p. 655–659.
18. Chen B., Schellman J. A. Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 1. Equilibrium studies // *Biochemistry*, 1989, 28, p. 685–691.
19. Chen C., Pearson A. M., Gray J. I. Meat mutagens // *Adv. Food Nutr. Res.*, 1990, 34, p. 387–449.
20. Cherkin A. D., Davis J. L., Garman M. W. *D*-proline: stereospecific-sodium chloride dependent lethal convulsant activity in the Chick // *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1978, 8, p. 623–625.
21. Collins K. D., Washabaugh M. W. The Hofmeister effect and the behavior of water at interfaces // *Quat. Rev. Biophys.*, 1985, 18, p. 323–422.
22. Creighton T. E. *Proteins: Structures and Molecular Properties.* — NY: W. H. Freeman Co., 1993. — P. 158–159.
23. Cuq J. L., Provansal M., Uilleuz F., Cheftel C. Oxidation of methionine residues of casein by hydrogen peroxide. Effects on *in vitro* digestibility // *J. Food Sci.*, 1973, 38, p. 11–13.
24. Dalgleish D. G., Srinivasan M., Singh H. Surface-properties of oil-in-water emulsion droplets containing casein and tween-60 // *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, p. 2351–2355.
25. Damodaran S. Influence of protein conformation on its adaptability under chaotropic conditions // *Int. J. Biol. Macromol.*, 1989, 11, p. 2–8.
26. Damodaran S. Interfaces, protein films, and foams // *Advan. Food Nutr. Res.*, 1990, 34, p. 1–79.
27. Damodaran S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation // *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, p. 262–269.
28. Damodaran S., Kinsella J. E. Flavor-protein interactions: binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects // *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28, p. 567–571.
29. Damodaran S., Kinsella J. E. Interaction of carbonyls with soy protein: thermodynamic effects // *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, p. 1249–1253.
30. Damodaran S., Sengupta T. Dynamics of competitive adsorption of s-casein and -casein at the oil-water interface: evidence for incompatibility of mixing at the interface // *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 1658–1665.
31. Dickinson E. Proteins at interfaces and in emulsions: stability, rheology and interactions // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1998, 88, p. 2973–2985.
32. Dickinson E., Matsummura Y. Time-dependent polymerization of β-lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions // *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, 13, p. 26–30.
33. Dill K. A., Dov A., Hutchinson K. Thermal stabilities of globular-proteins // *Biochemistry*, 1989, 28, p. 5439–5449.
34. Dyer J. M., Nelson J. W., Murai N. Biophysical analysis of phaseolin denaturation induced by urea, guanidinium chloride, Ph, and temperature // *J. Protein Chem.*, 1992, 11, p. 281–288.
35. Eggum B. O., Beames R. M. The nutritive value of seed proteins // *Seed Proteins* / W. Gottschalk, H. P. Muller, eds. — The Hague: Nijhoff/Junk, 1983. — P. 499–531.
36. Erbersdobler H. R., Lohmann M., Buhl K. Utilization of early Maillard reaction products by humans // *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* / Friedman M., ed. — Advan. Expt. Med. Biol., vol. 289. — NY: Plenum Press, 1991. — P. 363–370.
37. Ewart J.A. D. Amino acid analysis of glutenins and gliadins // *J. Sci. Food Agric.*, 1967, 10, p. 111–117.
38. Fang Y., Dalgleish D. G. Competitive adsorption between ioleoylphosphatidylcholine and sodium caseinate on oil-water interfaces // *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, p. 59–64.
39. Protein Quality Evaluation: Report of a Joint FAO/WHO expert Consultation. — Geneva: FAO, 1991. — FAO Food Nutr. Paper 51. — P. 23–24.
40. Energy and protein requirements: Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. — Geneva: WHO, 1985. — World Health Organization Technical Rep. Ser. 724.

41. Fauchere J. L., Pliska V. Hydrophobic parameters-pi of amino-acid side-chains from the partitioning of n-acetyl-amino-acid amides // *Eur. J. Med. Chem.*, 1983, 18, p. 369–375.
42. Fay L., Richli U., Liardon R. Evidence for the absence of amino acid isomerization in microwave-heated milk and infant formulas // *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, p. 1857–1859.
43. Ferry J. D. Viscoelastic Properties of Polymers. — NY: Wiley, 1961. — P. 391.
44. Ford J. E. Microbiological methods for protein quality assessment // *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation* / C. E. Bodwell, J. S. Adkins, D. T. Hopkins, eds. — Westport, Connecticut: AVI Publishing Co., 1981. — P. 278–305.
45. Friedman M., Gumbmann M. R. Nutritional improvement of legume proteins through disulfide interchange // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986, 199, p. 357–390.
46. Fujita Y. Noda Y. The effect of hydration on the thermal stability of ovalbumin as measured by means of differential scanning calorimetry // *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1981, 54, p. 3233–3234.
47. Gekko K., Hasegawa Y. Compressibility-structure relationship of globular proteins // *Biochemistry*, 1986, 25, p. 6563–6571.
48. Gonzalez J. M., Damodaran S. Recovery of proteins from raw sweet whey using a solid state sulfitolysis // *J. Food Sci.*, 1990, 55, p. 1559–1563.
49. Gonzalez J. M., Damodaran S. Sulfitolysis of disulfide bonds in proteins using a solid state copper carbonate catalyst // *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, p. 149–153.
50. Gosal W. S., Ross-Murphy S. B. Globular protein gelation [Review] // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2000, 5, p. 188–194.
51. Grandori R., Matecko I., Mayr P., Muller N. Probing protein stabilization by glycerol using electrospray mass spectrometry // *J. Mass. Spec.*, 2001, 36, p. 918–922.
52. Griebenow K., Klibanov A. M. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents // *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, p. 11695–11700.
53. Gumbmann M. R., Spangler W. L., Dugan G. M., Rackis J. J. Safety of trypsin inhibitors in the diet: effects on the rat pancreas of long-term feeding of soy flour and soy protein isolate // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986, 199, p. 33–79.
54. Harwalkar V. R., Ma C.-Y. Effects of medium composition, preheating, and chemical modification upon thermal behavior of oat globulin and β-lactoglobulin // *Food Proteins* / J. E. Kinsella, W. G. Soucie, eds. — Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 1989. — P. 210–231.
55. Hayase P., Kato H., Fujimaki M. Racemization of amino acid residues in proteins during roasting // *Agric. Biol. Chem.* 1973, 37, p. 191–192.
56. He X. M., Carter D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin // *Nature*, 1992, 358, p. 209–214.
57. Heremans K. High pressure effects on proteins and other biomolecules // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1982, 11, p. 1–21.
58. Ikura K., Yoshikawa M., Sasaki R., Chiba H. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase // *Agric. Biol. Chem.*, 1981, 45, p. 2587–2592.
59. Israelachvili J., Pashley R. The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance // *Nature*, 1982, 300, p. 341–342.
60. Jagerstad M., Skog K. Formation of meat mutagens // *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* / M. Friedman, ed. — Advan. Expt. Med. Biol., vol. 289. — NY: Plenum Press, 1991. — P. 83–105.
61. Kamtekar S., Schiffer J., Xiong H., Babik J. M., Hecht M. H. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids // *Science*, 1993, 262, p. 1680–1685.
62. Kato A., Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins // *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 624, p. 13–20.
63. Kato S., Osako Y., Matsudomi N., Kobayashi K. Changes in emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation // *Agric. Biol. Chem.*, 1983, 47, p. 33–38.
64. Kinsella J. E., Damodaran S., German J. B. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins // *New Protein Foods: Seed Storage Proteins* / A. M. Altshul, H. L. Wilcke, eds. — London: Academic Press, 1985. — P. 107–179.
65. Kinsella J. E., Fox P. F. Water sorption by proteins: milk and whey proteins // *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1986, 24, p. 91–139.
66. Kinsho T., Ueno H., Hayashi R., Hashizume C., Kimura K. Sub-zero temperature inactivation of carboxypeptidase Y under high hydrostatic pressure // *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, p. 4666–4674.
67. Kiosseoglou V., Perdikis A. Stability of bovine serum albumin-stabilized olive oil-in-water emulsions and the role of the oil minor surface-active lipids // *Food Hydrocolloids*, 1994, 8, p. 27–32.
68. Koshiyama I. Purification and physicochemical properties of US globulin in soybean seeds // *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1972, 4, p. 167–171.
69. Kulmyrzaev A., Bryant C., McClements D. J. Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 1593–1597.
70. Kuntz I. D. Hydration of Macromolecules. III. Hydration of polypeptides // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, 93, p. 514–516.
71. Kuntz I. D., Kauzmann W. Hydration of proteins and polypeptides // *Adv. Protein Chem.*, 1974, 28, p. 239–345.
72. Lado B. H., Yousef A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms // *Microbes Infect.*, 2002, 4, p. 433–440.

73. Lapanje S. Physicochemical Aspects of Protein Denaturation. — NY: Wiley-Intercience, 1978.
74. Lawrence M. C., Suzuki E., Varghese J. N., Davis P. C., Van Donkelaar A., Tulloch P. A., Colman P. M. The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 A resolution // *EMBO J.*, 1990, 9, p. 9–15.
75. Li P., Reilly J., Ford C. Effect of introducing proline residues on the stability of *Aspergillus awamori* // *Protein Eng.*, 1997, 10, p. 1199–1204.
76. Liao S. Y., Mangino M. E. Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey protein concentrates // *J. Food Sci.*, 1987, 52, p. 1033–1037.
77. Liardon R., Friedman M. Effect of peptide bond cleavage on the recemization of amino acid residues in proteins // *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, p. 661–667.
78. Liardon R., Ledermann D. Racemization kinetics of free and protein-bound amino acids under moderate alkaline treatment // *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34, p. 557–565.
79. MacRitchie F. Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality // *Adv. Protein Chem.*, 1992, 36, p. 2–89.
80. MacRitchie R., de Cros D. L., Wrigley C. W. Flour polypeptides related to wheat quality // *Adv. Cereal Sci. Tech.*, 1990, 10, p. 79–145.
81. Mahmoud M. I., Malone W. T., Cordle C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties // *J. Food Sci.*, 1992, 57, p. 1223–1227.
82. Mak A., Smillie L. B., Stewart G. A comparison of the amino acid sequences of rabbit skeletal muscle and tropomyosins // *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, p. 3647–3655.
83. Marable N. L., Sanzone G. *In vitro* assays of protein quality assays utilizing enzymatic hydrolyses // *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation* / C. E. Bodwell, J. S. Adkins, D. T. Hopkins, eds. — Westport, Connecticut: AVI Publishing Co., 1981. — P. 261–277.
84. Miller S., Janin J., Lesk A. M., Chothia C. Interior and surface of monomeric proteins // *J. Mol. Biol.*, 1987, 196, p. 641–656.
85. Motoki M., Aso H., Seguro K., Nio N. α_{s1}-casein film prepared using transglutaminase // *Agric. Biol. Chem.*, 1987, 51, p. 993–996.
86. Nakagawa M. Yokoyama Y., Kato S., Hino T. Dye-sensitized photo-oxygenation of tryptophan // *Tetrahedron*, 1985, 41, p. 2125–2132.
87. Nakamura S., Tanaka T., Yada R. Y., Nakai S. Improving the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introducing proline into the active site helix // *Protein Eng.*, 1997, 10, p. 1263–1269.
88. Namiki M. Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens // *Adv. Food Res.*, 1988, 32, p. 115–184.
89. Nielsen N. C. Structure of soy proteins // *New Protein Foods: Seed Storage Proteins* /A. M. Altshul, H. L. Wilcke, eds. — Vol. 5. — NY: Academic Press, Inc., 1985. — P. 27–64.
90. Nio N., Motoki M., Takinami K. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase // *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50, p. 851–855.
91. Nio N., Motoki M., Takinami K. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase // *Agric. Biol. Chem.*, 1985, 49, p. 2283–2286.
92. Nishioka G. M., Ross S. Anew method and apparatus for measuring foam stability // *J. Coll. Interf. Sci.*, 1981, 81, p. 1–7.
93. Ohnishi T., Asakura T. Denaturation of oxyhemoglobin S by mechanical shaking // *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 453, p. 93–100.
94. Okomoto M., Kawamura Y., Hayashi R. Application of high pressure to food processing: textural comparison of pressure- and heat-induced gels of food proteins // *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, p. 183–189.
95. O'Neill T. E., Kinsella J. E. Binding of alkanone flavors to β-lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification // *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, p. 770–774.
96. Ortiz R., Sanchez R., Paez A., Montano L. F., Zenteno E. Induction of intestinal malabsorption syndrome in rats fed with *Agaricus bisporus* mushroom lectin // *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, p. 1375–1378.
97. Pahud J.-J., Monti J. C., Jost R. Allergenicity of whey proteins: its modification by tryptic *in vitro* hydrolysis of the protein // *J. Pediatr. Gastrointeral. Nutr.*, 1985, 4, p. 408–415.
98. Papiz M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos E. E., North A. C. T., Findlay J. B. C., Sivaprasadarao R., Jones T. A., Newcomer M. E. Kraulis P. J. The structure of β-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein // *Nature*, 1986, 324, p. 383–385.
99. Pearce K. N., Kinsella J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique // *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, p. 716–722.
100. Polyakov V. L., Grinberg V. Y., Tolstoguzov V. B. Thermodynamic compatibility of proteins // *Food Hydrocolloids*, 1997, 11, p. 171–180.
101. Ponnuswamy P. K., Muthusamy R., Manavalan P. Amino acid composition and thermal stability of proteins // *Int. J. Biol. Macromol.*, 1982, 4, p. 186–190.
102. Poole S., West S. I., Walters C. L. Protein-protein interactions: their importance in the foaming of heterogeneous protein systems // *J. Sci. Food Agric.*, 1984, 35, p. 701–711.

103. Pusztai A., Clarke E. M. W., Grant G., King T. P. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemicals studies // *J. Sci. Food Agric.*, 1981, 32, p. 1037–1046.
104. Rao M. A., Damodaran S., Kinsella J. E., Cooley H. J. Flow properties of 7S and 11S soy protein fractions // *Food Engineering and Process Applications* / M. Le Maguer, P. Jelen, eds. — NY: Elsevier Applied Sci., 1986. — P. 39–48.
105. Razumovsky L., Damodaran S. Incompatibility of mixing of proteins in adsorbed binary protein films at the air-water interface // *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 3080–3086.
106. Razumovsky L., Damodaran S. Surface activity — compressibility relationship of proteins // *Langmuir*, 1999, 15, p. 1392–1399.
107. Richards F. M. Areas, volumes, packing, and protein structure // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, 6, p. 151–176.
108. Ritchey S. J., Taper L. J. Estimating protein digestibility for humans from rat assays // *Protein Quality in Humans: Assessment and in vitro Estimation* / C. E. Bodwell, J. S. Adkins, D. T. Hopkins, eds. — Westport, Connecticut: AVI Publishing Co., 1981. — P. 306–315.
109. Rupley J. A., Yang P.-H., Tollin G. Thermodynamic and related studies of water interacting with proteins // *Water in Polymers* / S. P. Rowland, ed. — ACS Symp. Ser. 127. — Washington, DC: American Chemical Society, 1980. — P. 91–139.
110. Russell R. J. M., Hough D. W., Danson M. J., Taylor G. L. The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilium* // *Structure*, 1994, 2, p. 1157–1167.
111. Russsell, R. J. M., Taylor G. L. Engineering thermostability — lessons from thermophilic proteins // *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1995, 6, p. 370–374.
112. Salim-Hanna M., Edwards A. M., Silva E. Obtention of a photo-induced adduct between a vitamin and an essential amino acid: binding of riboflavin to tryptophan // *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 1987, 57, p. 155–159.
113. Scheraga H. A. Intramolecular bonds in proteins II. Noncovalent bonds // *The Proteins* / H. Neurath, ed. — 2nd ed., vol. 1. — NY: Academic Press, 1963. — P. 478–594.
114. Sengupta T., Damodaran S. Lateral phase separation in adsorbed binary protein films at the air-water interface // *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 3087–3091.
115. Shewry P. R., Tatham A. S. Disulphide bonds in wheat gluten proteins // *J. Cereal Sci.*, 1997, 25, p. 207–227.
116. Shimada K., Matsushita S. Relationship between thermo-coagulation of proteins and amino acid compositions // *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28, p. 413–417.
117. Shortle D., Stites W. E., Meeker A. K. Contributions of the large hydrophobic amino-acids to the stability of staphylococcal nuclease // *Biochemistry*, 1990, 29, p. 8033–8041.
118. Singer N. S., Latella J., Shoji Y. Fat emulating protein products and processes. — U.S. Patent № 4 961 953. — 1990.
119. Suzuki A., Watanabe M., Iwamura K., Ikeuchi Y., Saito M. Effect of high pressure treatment on the ultrastructure and myofibrillar protein of beef skeletal muscle // *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, p. 3085–3091.
120. Swaisgood H. E., Catignani, G. L. Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment // *Adv. Food Nutr. Res.* 1991, 35, p. 185–236.
121. Tanford C. Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable spheres // *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, 79, p. 5333–5339.
122. Taylor L. S., York P., Williams A. C., Edwards H. G. M., Mehta V., Jackson G. S., Badcoe I. G., Clarke A. R. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent // *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1253, p. 39–46.
123. Utsumi S., Matsumura Y., Mori T. Structure-function relationship of soy proteins // *Food Protein and Their Applications* / S. Damodaran, A. Paraf, eds. — NY: Marcel Dekker, 1997. — P. 257–291.
124. Wang C.-H., Damodaran S. Thermal destruction of cysteine and cystine residues of soy protein under conditions of gelation // *J. Food Sci.*, 1990, 55, p. 1077–1080.
125. Wang C.-H., Damodaran S. Thermal gelation of globular proteins: weight average molecular weight dependence of gel strength // *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, p. 1154–1164.
126. Watanabe K., Chishiro K., Kitamura K., Suzuki Y. Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006 // *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, p. 24287–24294.
127. Weber G. *Protein Interactions*. — NY: Chapman and Hall, 1992. — P. 235–270.
128. Weber G., Drickamer H. G. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules // *Quaterly Rev. Biophys.*, 1983, 16, p. 89–112.
129. Wedzicha B. L., Bellion I., Goddard S. J. Inhibition of browning by sulfites // *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* / M. Friedman, ed. — Advan. Expt. Med. Biol., vol. 289. — NY: Plenum Press, 1991. — P. 217–236.
130. Xu S., Damodaran S. Comparative adsorption of native and denatured egg-white, human and T4 phage lysozymes at the air-water interface // *J. Coll. Interf. Sci.*, 1993, 159, p. 124–133.
131. Yamashita M., Arai S., Imaizumi Y., Amano Y., Fujimaki M. A one-step process for incorporation of L-methionine into soy protein by treatment with papain // *J. Agric. Food Chem.* 1979, 27, p. 52–56.
132. Yip K. S. P., Stillman T. J., Britton K., Artymium P. J., Baker P. J., Sedelnikova S. E., Engel P. C., Pasquo A., Chiaraluce R., Consalvi V., Scandurra R., Rice D. W. The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehaydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures // *Structure*, 1995, 3, p. 1147–1158.

133. Yu M.-A., Damodaran S. Kinetics of protein foam destabilization: evaluation of a method using bovine serum albumin // *J. Agric. Food Chem.,* 1991, 39, p. 1555–1562.
134. Zhu H., Damodaran S. Effects of calcium and magnesium ions on aggregation of whey protein isolate and its effect on foaming properties // *J. Agric. Food Chem.,* 1994, 42, p. 856–862.
135. Zhu H., Damodaran S. Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties // *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, p. 846–855.
136. Zhu H., Damodaran S. Proteose peptones and physical factors affect foaming properties of whey protein isolate // *J. Food Sci.,* 1994, 59, p. 554–560.
137. Zuber H. Temperature adaptation of lactate dehydrogenase. Structural, functional and genetic aspects // *Biophys. Chem.,* 1988, 29, p. 171–179.

6. ФЕРМЕНТЫ

Кирк Л. Паркин (*Kirk L. Parkin*)
Перевод д-ра. хим. наук С. В. Макарова под науч. ред. д-ра биол. наук, проф. В. М. Коденцовой и канд. биол. наук О. А. Вржесинской

СОДЕРЖАНИЕ

6.1. Введение . 314
6.2. Общая природа ферментов . . 315
6.2.1. Ферменты как биокатализаторы 315
6.2.2. Белковая и небелковая природа ферментов 315
6.2.3. Каталитическая активность ферментов . . . 316
6.2.3.1. Теория столкновений в катализе . . 317
6.2.3.2. Теория переходного состояния в ферментативном катализе 317
6.2.4. Механизмы ферментативного катализа 319
6.2.4.1. Природа активных центров ферментов . . 319
6.2.4.2. Специфические каталитические механизмы 320
6.2.5. Кинетика ферментативных реакций . . 328
6.2.5.1. Простые модели ферментативных реакций 328
6.2.5.2. Уравнения скорости ферментативных реакций . 329
6.2.5.3. Графический анализ ферментативных реакций . 330
6.2.6. Специфичность и селективность ферментов . 334
6.2.6.1. Специфические свойства важнейших пищевых ферментов . . 334
6.2.6.2. Номенклатура и классификация ферментов . . . 339
6.3. Применение экзогенных ферментов в производстве пищевых продуктов . 341
6.3.1. Общие положения 341
6.3.2. Ферменты, катализирующие превращения углеводов 341
6.3.2.1. Ферменты, катализирующие превращения крахмала . . . 343
6.3.2.2. Превращения сахаров . 350
6.3.2.3. Ферментативные превращения пектина . 352
6.3.2.4. Прочие гликозидазы 356
6.3.3. Ферменты, катализирующие превращения белков 357
6.3.3.1. Сериновые протеазы 357
6.3.3.2. Аспарагиновые (кислотные) протеазы . . . 357
6.3.3.3. Цистеиновые (сульфгидрильные) протеазы 358
6.3.3.4. Металлопротеазы . . . 358
6.3.3.5. Использование протеолитического эффекта . 360
6.3.3.6. Трансглютаминаза . 363
6.3.4. Ферменты, преобразующие липиды . . . 364
6.3.4.1. Липаза 364
6.3.4.2. Применение липаз . . 365
6.3.4.3. Липоксигеназы . . 367
6.3.4.4. Фосфолипазы 368
6.3.5. Прочие области применения ферментов 368
6.4. Влияние внешних факторов на активность ферментов . . . 368
6.4.1. Температура . . 368
6.4.1.1. Влияние температуры на активность ферментов 368

6.4.1.2. Оптимум температуры для функционирования фермента 370
6.4.1.3. Заключительные замечания 371
6.4.2. Влияние pH ... .371
6.4.2.1. Общие замечания 371
6.4.2.2. Стабильность ферментов как функция pH 372
6.4.2.3. Влияние pH на активность ферментов 373
6.4.2.4. Другие типы pH зависимости активности ферментов ... 377
6.4.3. Активность ферментов и содержание влаги ... 377
6.4.3.1. Дегидратация и активность воды..... .377
6.4.3.2. Осмотические эффекты дегидратации 380
6.4.3.3. Дегидратация при замораживании 381
6.5. Эндогенные ферменты пищевых продуктов и их контроль ... 383
6.5.1. Клеточные и тканевые ферментативные эффекты 383
6.5.2. Активность ферментов и цвет пищевых продуктов 385
6.5.2.1. Фенолоксидазы..... 385
6.5.2.2. Пероксидазы 389
6.5.2.3. Прочие оксидоредуктазы ... 392
6.5.3. Ферменты, участвующие в формировании вкуса и аромата. 392
6.5.3.1. Липоксигеназа ... 392
6.5.3.2. Гидропероксидлиаза и ее превращения 396
6.5.3.3. Биогенез прочих видов аромата, обусловленных липидами. .398
6.5.3.4. Возникновение и контроль едкого аромата, а также других биологически обусловленных факторов ... 398
6.5.4. Ферменты, влияющие на текстуру пищевых продуктов 402
6.5.4.1. Контроль ферментов, модифицирующих полисахариды 402
6.5.4.2. Контроль ферментов, модифицирующих белки. .403
6.5.4.3. Исправление дефектов текстуры пищевых продуктов с помощью контроля активности ферментов небольшими молекулами 404
Дополнительная литература 405
Литература 406

6.1. Введение

Понятие «ферменты» использовалось еще в XVII–XIX веках для обозначения энзимов живых и дышащих тканей. Примерами действия пищевых ферментов могут служить спиртовое брожение, пищеварительные процессы у животных, а также диастатическая активность, обеспечивающая превращение крахмала в сахара при солодоращении. Более современное понятие «энзим» (от греч. *enzyme* — «в дрожжах») было введено В. Кюне (*W. Kuehne*) в 1878 г.[1] Таким образом, ранняя биохимия неотделима от того, что в настоящее время называется пищевой биотехнологией.

Пищевые ферменты можно разделить на два типа: *экзогенные*, которые добавляют в пищевые продукты для достижения нужного эффекта, и *эндогенные*, которые изначально присутствуют в пищевых продуктах и влияют (или не влияют) на их качество. Экзогенные ферменты могут быть получены из разных источников, отличающихся по цене и функциональным свойствам, определяющим их каталитическую активность, селективность и стабильность в разных условиях. Эндогенные ферменты контролировать сложнее, поскольку в пищевом матриксе они присутствуют в разных количествах. Это накладывает ограничения на способы обработки продуктов в целях регулирования действия ферментов. В некоторых продуктах эндогенные ферменты улучшают качество пищевых продуктов, а в других его снижают. В этой главе мы

[1] В русском переводе мы будем использовать более привычное отечественным пищевикам понятие «ферменты» — *Примеч. ред.*

рассмотрим химические основы функционирования ферментов и покажем, как знание этих основ можно использовать для контроля активности ферментов при переработке пищевых продуктов, для получения пищевых ингредиентов, а также для обеспечения и повышения качества готовой продукции.

6.2. Общая природа ферментов

6.2.1. Ферменты как биокатализаторы

Ферментам присущи три характерные черты: они являются белками, катализаторами и обладают селективным действием на субстраты. Ферменты — это наиболее распространенная уникальная группа биологических катализаторов. Они отвечают за жизненные процессы и являются своего рода посредниками в реакциях синтеза и перехода веществ из одной формы в другую, а также при осуществлении сигнальных функций и обмена веществ.

6.2.2. Белковая и небелковая природа ферментов

Все ферменты являются белками — полимерами, состоящими из природных *L*-аминокислот. Молекулярная масса белков варьирует примерно от 8000 Да (например, тиоредоксины и глютаредоксины, содержащие около 70 аминокислот) до 4600 кДа (пируват-декарбоксилазный комплекс). Самые крупные ферменты состоят из нескольких полипептидных цепей (субъединиц) и обладают четвертичной структурой. Эти субъединицы обычно связаны нековалентными силами (см. главу 5), и их ассоциации могут включать идентичные (гомологичные) или различные (гетерологичные) полипептидные цепи. Олигомерные ферменты могут обладать несколькими активными центрами, причем одна полипептидная цепь некоторых крупных ферментов может проявлять несколько каталитических активностей. Так, «разносторонняя» активность комплекса синтетазы жирных кислот высших организмов ассоциируется с различными белковыми доменами полипептида, и эти крупные полипептиды могут далее образовывать димеры или олигомеры. Мономерные ферменты с одним активным центром также могут иметь разные домены внутри полипептидной цепи, каждый с неодинаковыми каталитическими или биологическими свойствами [28, 41, 84].

У некоторых ферментов каталитические свойства обусловлены наличием небелкового фрагмента, называемого «кофактором», «коферментом» или «простетической группой» [104]. Большинство подобных кофакторов содержат ионы металлов (в металлоферментах), флавины (во флавоферментах), биотин, липоат, витамины группы В и производные никотинамида (которые в действительности являются прочно связанными косубстратами, участвующими в обратимых редокс-превращениях). Ферменты, имеющие кофакторы, называют «холоферментами», а не имеющие их (без каталитической функции) — «апоферментами». К другим небелковым компонентам ферментов относятся связанные липиды (в липопротеинах), углеводы (в *ASN** гликопротеинов) или фосфаты (в *SER* фосфопротеинов). Несмотря на то что обычно эти фрагменты не обладают каталитической функцией, они влияют на физико-химические свойства ферментов и предоставляют ферменту клеточные распознающие сайты. Для придания активности предшественникам («прекурсорам») ферментов (так называемым «зимогенам») необходимо провести их специальную протеолитическую обработку (например, пищеварительных ферментов и телячьего химозина).

Мономерные ферменты, существующие в виде одной полипептидной цепи, обычно имеют молекулярную массу 13–50 кДа. Масса большинства клеточных ферментов составляет около 30–50 кДа, у олигомерных белков, состоящих из субъединиц массой 20–60 кДа, она составляет 80–100 кДа, и лишь примерно у 1–3% клеточных белков она превышает 249 кДа [120]. Олигомерные белки зачастую участвуют в метаболических процессах, и присутствие субъединиц позволяет регулировать содержание метаболитов, аллостерическое поведение и взаимодействие с другими клеточными компонентами и структурами.

Внеклеточные и секретируемые ферменты обычно небольшие и представляют собой мономерные пептиды. Они зачастую обладают гидролитической активностью и более стабильны, чем внутриклеточные ферменты. Эти гидролитические внеклеточные ферменты способствуют продвижению и усвоению ну-

* Аминокислотные остатки в ферментах обозначают с помощью общепринятых трехбуквенных прописных символов. Положение в первичной белковой последовательности обозначается при необходимости с помощью подстрочных символов. — *Примеч. авт.*

триентов, а также реакциям на факторы роста из окружающей среды — иначе (микро)организм не сможет контролировать такие внешние факторы, как температура, значение pH и ее состав.

Многие используемые в пищевых продуктах экзогенные ферменты получают в больших объемах и достаточно быстро из микроорганизмов путем изоляции из биомассы. Ферменты можно также экстрагировать из источников животного и растительного происхождения, причем для некоторых пищевых продуктов такие экстракты более предпочтительны. Микробные источники ферментов продолжают оставаться объектами пристального внимания ученых, поскольку селекция штаммов и молекулярные технологии позволяют быстро выбрать или модифицировать именно тот фермент, который необходим для производства данного пищевого продукта.

Ферменты могут существовать в различных формах, слегка отличаясь по первичной структуре (последовательности) и обладая при этом почти одинаковыми каталитическими свойствами. Эти небольшие различия могут проявляться как в незначительных, так иногда и в существенных различиях в селективности и оптимуме pH и температуры. Такие формы называют ферментными изоформами (ранее для их обозначения использовали понятия «изоцимы» и «изоферменты»).

Полученные данные о структуре белков позволили разделить все ферменты на таксономические «семейства» в зависимости от их каталитических свойств и особенностей строения. Эта классификация отражает историю развития науки о ферментах, так как структурные элементы зачастую обозначают бытовыми словечками, а не научными терминами («бочка», «пропеллер», «рулет» и т. п.). Знание последовательности расположения пептидов в ферментах позволяет разделить их на группы в зависимости от сходства первичной последовательности (гомологии) и присутствия повторяющихся фрагментов, состоящих из мелких пептидов. Это дает возможность подтвердить существование тех или иных активных центров в близких по строению ферментах. Знания о влиянии структуры фермента на его каталитические свойства необходимы для эффективного использования ферментов в пищевых технологиях.

6.2.3. Каталитическая активность ферментов

Катализаторы — это соединения, ускоряющие реакцию и при этом химически не изменяющиеся и не расходующиеся. Каталитический эффект обусловлен понижением энергетического барьера, необходимого для превращения исходных веществ в продукты реакции. Лучше всего это можно проиллюстрировать с помощью гипотетической «координаты реакции», показывающей изменение свободной энергии в ходе реакции (рис. 6.1). Превращение субстрата (S) в продукт (P) проходит в несколько этапов. В каталитической реакции субстрат преодолевает переходное состояние ($S^{\ddagger}$) с меньшими затратами свободной энергии (энергии Гиббса, *примеч. перев.*) ($\Delta G^{\ddagger}_{кат}$), чем в некаталитической реакции ($\Delta G^{\ddagger}_{некат}$). На рис. 6.1 представлено определенное упрощение, так как по ходу реакции может быть несколько промежуточных состояний, но обычно существует одна так называемая «критическая» или «скоростьлимитирующая» стадия с наибольшим значением свободной энергии [145], определяющая скорость процесса в целом. Реакции, сопровождающиеся уменьшением свободной энергии ($\Delta G < 0$), протекают самопроизвольно, однако их скорость может существенно различаться (термодинамически скорость реакции определяется значением энергии активации, $\Delta G^{\ddagger}$) [28, 41, 52,138].



Рис. 6.1. Координаты каталитической и некаталитической реакций

Во избежание двусмысленного толкования каталитической активности ферментов разработана специальная терминология [3]. Международная единица каталитической активности ферментов (U) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту при стандартных (обычно оптимальных) условиях. В системе СИ единицей ферментативной активности является *катал*, то есть такое количество фермента, которое вызывает превращение одного моля субстрата в секунду в определенных условиях. Молекулярная активность фермента определяется как «число превращений» (k_{cat}), то есть число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой (активным сайтом) фермента в минуту при определенных условиях. Верхний предел k_{cat} для ферментов составляет около 10^7.

Таблица 6.1
Примеры каталитической активности ферментов. По [81, 105, 141]

Реакция	Катализатор	Свободная энергия активации (ккал/моль)	Относительная скорость реакции[a]
$H_2O_2 \rightarrow 1/2O_2 + H_2O$	Нет (водный раствор)	18,0	1,0
	Иодид	13,5	$2{,}1 \cdot 10^3$
	Платина	11,7	$4{,}2 \cdot 10^4$
	Каталаза (1.11.1.6)	5,5	$1{,}5 \cdot 10^9$
Гидролиз *p*-нитрофенилацетата	Нет (водный раствор)	21,9	1,0
	H^+	18,0	$7{,}2 \cdot 10^2$
	OH^-	16,2	$1{,}5 \cdot 10^4$
	Имидазол	15,9	$2{,}5 \cdot 10^4$
	Сывороточный альбумин[b]	15,3	$6{,}9 \cdot 10^4$
	Липопротеинлипаза	11,4	$5{,}0 \cdot 10^7$
Гидролиз сахарозы	H^+	25,6	1,0
	Инвертаза (3.2.1.26)	11,0	$5{,}1\ 10^{10}$
$(NH_2)2CO + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$	H^+	24,5	1,0
	Уреаза (3.5.1.5)	8,7	$4{,}2 \cdot 10^{11}$
Гидролиз казеина	H^+	20,6	1,0
	Трипсин (3.4.4.4)	12,0	$12{,}0 \cdot 10^6$
Гидролиз этилбутирата	H^+	13,2	1,0
	Липаза (3.1.1.3)	4,2	$4{,}0 \cdot 10^6$

[a] Относительные скорости рассчитаны с использованием выражения $e^{-E_a/RT}$ (уравнение 6.1) при 25°C.
[b] Не является ферментативной реакцией.

6.2.3.1. Теория столкновений в катализе

Существуют два подхода к количественному определению скорости (кинетики) химической реакции и катализа. Простейшим подходом является применение *теории столкновений*, где константа скорости химической реакции k определяется по выражению

$$k = PZe^{-E_a/RT}, \tag{6.1}$$

где P — вероятность протекания реакции, зависящая от ориентации молекул; Z — частота столкновений (экспоненциальный член соответствует доли сталкивающихся частиц с необходимой для осуществления реакции энергией активации (E_a); R — универсальная газовая постоянная; T — температура.

В наибольшей степени скорость реакции определяется экспоненциальным членом. Так, при увеличении температуры на 10 °C величина Z возрастает лишь на ~4%, а $e^{-E_a/RT}$ — на 100% (то есть в два раза) при $E_a = 12$ ккал/моль (энергия активации ферментативных реакций обычно изменяется в пределах 6–15 кКал/моль) [113]). Уравнение (6.1) было выведено С. Аррениусом в конце XIX века по эмпирическим данным и нашло широкое применение в кинетике ферментативных реакций (см. раздел 6.4.1).

6.2.3.2. Теория переходного состояния в ферментативном катализе

Другой более важный для анализа механизма химических реакций подход основывается на теории переходного состояния абсолютных скоростей реакций, разработанной в 1930-х гг. Эйрингом (а также Эвансом и Поляни, *примеч. перев.*). Эта теория базируется на предположении, что для осуществления реакции субстрат S должен перейти в «активированное» или переходное ($S^‡$) состояние, способное затем трансформироваться в продукт P (см. рис. 6.1). Соотношение S и $S^‡$ определяется константой псевдоравновесия $K^‡$:

$$K^‡ = S^‡/S, \tag{6.2}$$

а скорость превращения $S^‡$ в P определяется как

$$dP/dt = k_d[S^‡], \tag{6.3}$$

где k_d — константа скорости первого порядка превращения $S^‡$ в P.

Важным термодинамическим параметром является изменение свободной энергии активации ($\Delta G^‡$) при переходе S в $S^‡$:

$$\Delta G^‡ = -RT \ln K^‡. \tag{6.4}$$

Объединив уравнения (6.2) и (6.4), получим

$$[S^‡] = [S]e^{-\Delta G^‡/RT}. \tag{6.5}$$

Константа скорости k_d (уравнение 6.3) эквивалентна частоте колебаний (ν) подвергающейся трансформации связи. Считается, что молекула в переходном состоянии имеет настолько слабую связь, что при следующем колебании она распадается [52]. Распад $S^‡$ происходит тогда, когда энергия колебаний связи становится равной потенциальной энергии и выполняется соотношение

$$k_d = \nu = k_B T/h, \tag{6.6}$$

где k_B — постоянная Больцмана; h — постоянная Планка.

Таким образом, эта теория предполагает, что все переходные состояния распадаются с одинаковой скоростью, то есть на скорость реакции с участием субстрата S влияют только [S], температура и $\Delta G^‡$ (определяющая $K^‡$, уравнение 6.4). После подстановки k_d и $S^‡$ из уравнений (6.6) и (6.5) уравнение (6.3) примет следующий вид:

$$\text{скорость} = dP/dt = k_S[S] = k_B T/h \times [S]e^{-\Delta G^‡/RT}. \tag{6.7}$$

Таким образом, при известном значении [S] можно экспериментально определить скорость и константу скорости реакции k_S ($k_S[S] = k\text{В}T/h \times [S]e^{-\Delta G^‡/RT}$) и затем рассчитать $\Delta G^‡$, $\Delta H^‡$ и $\Delta S^‡$.

Если известна величина, на которую уменьшается свободная энергия активации в присутствии катализатора, то по уравнениям (6.1) или (6.7) можно рассчитать или спрогнозировать, насколько увеличится скорость реакции, причем результат расчета по обоим уравнениям будет одинаковым (все определяется экспоненциальным членом). Например, если фермент понижает энергию активации ($G^‡$ или E_a) химической реакции на 5,4 ккал/моль (что не очень много), то скорость реакции увеличивается в 250 000 раз.

Теория переходного состояния достаточно просто объясняет то, как действуют ферменты, чем определяется их каталитическая активность, а также чем они отличаются от антител (и те и другие распознают лиганды). В ходе катализируемой ферментом реакции субстрат (S) сначала присоединяется к свободному ферменту (E), образуя комплекс, находящийся как в основном (ES), так и активированном состоянии ($ES^‡$). Фермент понижает $\Delta G^‡$ и, следовательно, увеличивает $K^‡$ или концентрацию активированных частиц $S^‡$ в стационарном состоянии по сравнению с некаталитической реакцией (см. рис. 6.1). Роль фермента в стабилизации переходного состояния можно более четко проиллюстрировать, используя модифицированную координату реакции (рис. 6.2, *а*) [41]. Образование комплекса ES, способствующее катализу (см. раздел 6.2.4.2), характеризуется свободной энергией связывания (ΔG_S) (для односубстратных реакций зачастую отрицательной). ΔG_S называют также «энергией связывания». Следующей стадией каталитической реакции является переход S в переходное состояние $ES^‡$, из которого затем получается продукт P и свободный фермент E. Термодинамически эта стадия характеризуется величиной $\Delta G^‡$. Минимальное суммарное изменение свободной энергии активации реакции $S \rightarrow P$ представляет собой ΔG_T, то есть сумму ΔG_S и $\Delta G^‡$. Преимущество фермента как катализатора при распознавании субстратов показано на рис. 6.2, *а*. Если связывающий участок фермента лучше распознает (является более комплементарным) основное состояние субстрата S, то улучшается сродство E к S и их связывание, характеризующееся более отрицательной величиной ΔG_S (рис. 6.2, *b*). Значение ΔG_T в этом случае не меняется, но зато возрастает $\Delta G^‡$. Увеличившийся энергетический барьер должен быть преодолен на стадии $ES \rightarrow ES^‡$. И наоборот, если связывающий центр фермента лучше распознает (более комплементарен) $S^‡$, то свободная энергия как суммарной реакции (ΔG_T), так и стадии образования или разрыва связи ($\Delta G^‡$) понижается (рис. 6.2, *с*). Отсюда понятно, что каталитическая активность фермента обусловлена распознаванием или стабилизацией переходного состояния S.*

* Фермент не распознает $S^‡$ в растворе, но преобразует S или стабилизирует $S^‡$ за счет связывания, используя часть энергии связывания и механических сил, вовлеченных в ферментативный катализ. — *Примеч. авт.*

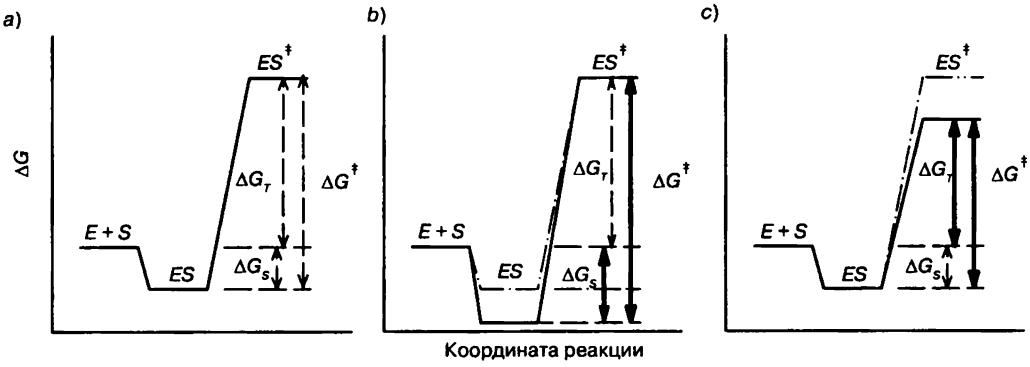


Рис. 6.2. Изменение ΔG в ходе ферментативной реакции: *a* — типичная ферментативная реакция; *b* — фермент более комплементарен основному состоянию субстрата (*S*); *c* — фермент более комплементарен переходному состоянию субстрата *S*. Полужирными стрелками обозначены изменения ΔG по сравнению с (*a*). По [41]

6.2.4. Механизмы ферментативного катализа

В молекулах ферментов имеются активные центры, связывающие *S* и стабилизирующие $S^{\ddagger}$. Аминокислотные остатки, образующие активный центр, а также кофакторы реагируют с субстратом за счет ковалентных и/или нековалентных взаимодействий. Ферменты по-разному катализируют процессы образования и разрыва связей, а также перераспределения атомов, причем механизм катализа зависит от состава аминокислот и их пространственного расположения в активном центре. Помимо аминокислот, *непосредственно* задействованных в каталитическом процессе, способствовать катализу через распознавание *S* и стабилизацию $S^{\ddagger}$ могут и другие аминокислоты [28, 41, 138].

6.2.4.1. Природа активных центров ферментов

В каталитическом процессе участвуют только определенные аминокислоты ферментов. Учитывая размеры белков, может показаться удивительным, что каталитической активностью обладает лишь ограниченное число аминокислот, чаще всего от 3 до 20 [120], причем это число обычно (но не всегда) больше для ферментов с большей молекулярной массой. С другой стороны, у ферментов, известных как сериновые протеазы, имеется от 185 до 800 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе 20–90 кДа (как правило, 25–35 кДа), но у них один и тот же каталитический центр (триада), состоящий из *HIS–ASP–SER*. Почему же ферменты содержат намного больше аминокислот, чем необходимо для катализа [120]? Ответственные за катализ аминокислотные остатки редко соседствуют друг с другом и распределены по полипептидной цепи. Например, триада HIS_{64}–ASP_{32}–SER_{221} является каталитической для протеазы *Bacillus subtilis* — субтилизина, а HIS_{257}–ASP_{203}–SER_{144} — для липазы *Rhizomucor miehei* (сериновые протеазы и липазы по механизму действия схожи) [20, 59]. Некаталитическая часть полипептидной цепи способствует правильному пространственному расположению каталитических фрагментов благодаря вторичной и третичной структуре белка. Точное пространственное расположение каталитических центров необходимо для их правильного функционирования. Полипептидный фолдинг (свертывание) сближает другие участки со специфическими связывающими свойствами, что способствует распознаванию субстрата. Таким образом, полипептидная конформация действует как своего рода строительные леса, обеспечивающие правильное пространственное расположение аминокислот с каталитическими и распознающими субстрат свойствами.

Еще одна роль полипептидной цепи — обеспечение такой упаковки атомов, при которой из внутренней неполярной части фермента исключается вода [41]. Для улучшения дипольного взаимодействия, позволяющего повысить эффективность катализа, требуется лишь ограниченное (до 25%) присутствие воды в объеме белка. Часть некаталитических аминокислотных остатков может участвовать в функционировании фермента в целом, выполняя роль кофактора или эффектора связывающих сайтов, поверхностных распознающих центров, обеспечивающих взаимодействие с другими компонентами клетки, а также выступающих в качестве «ловушек» субстрата [41, 120]. И наконец, аминокислоты, не участвующие в ката-

лизе или распознавании субстрата, могут определять чувствительность белковой конформации к изменениям pH, ионной силы и температуры, то есть влиять на активность и стабильность фермента.

6.2.4.2. Специфические каталитические механизмы

Механизмы ферментативных реакций можно разделить на четыре основные группы [28, 52]: сближения, ковалентного катализа, общего кислотно-основного катализа и молекулярного напряжения или искажения (табл. 6.2) [28,104,138]). Другие участвующие в катализе взаимодействия мы рассмотрим в соответствующих разделах.

Таблица 6.2
Общие механизмы ферментативного катализа. По [28, 104, 138]

Механизм	Взаимодействия или явления, обусловливающие катализ	Фрагменты или кофакторы, потенциально вовлекаемые в катализ
Сближения	Моделируемые как внутри- или межмолекулярный катализ	Активный центр и распознающие субстрат фрагменты
Ковалентный катализ	Нуклеофильные	*SER*, *THR*, *TYR*, *CYS*, *HIS* (основание), *LYS* (основание), ASP^-, GLU^-
	Электрофильные	*LYS* (основание Шиффа), пиридоксаль, тиамин, катионы металлов
Общий кислотно-основный катализ	Протонирование/депротонирование, стабилизация заряда	*HIS*, *ASP*, *GLU*, *CYS*, *TYR*, *LYS*
Молекулярное напряжение или искажение	Индуцированные соответствие или напряжение, поворотный механизм, конформационная гибкость	Активный центр и распознающие субстрат фрагменты

6.2.4.2.1. Роль энергии связывания

Перед рассмотрением основных типов ферментативного катализа необходимо остановиться на роли энергии связывания (см. раздел 6.2.3.2), поскольку она важна для любого механизма. Понятие «энергия связывания» относится к взаимодействиям субстрата и активного центра фермента [28, 41, 138] и обусловлено комплементарностью фермента и субстрата. Комплементарность либо существует до связывания (концепция «ключ–замок» Э. Фишера), либо «появляется» при связывании, либо является комбинацией этих двух вариантов. Энергия связывания может быть также определена как изменение свободной энергии (зачастую отрицательная величина) вследствие десольватации субстрата и его взаимодействия с ферментом. Уменьшение энтропии за счет образования «фермент–субстратного» комплекса компенсируется ее возрастанием при десольватации (обычно дегидратации). Часть энергии связывания может быть полезна для катализа, то есть преобразовываться в механическую и/или химическую энергию активации. Она может использоваться для мобилизации субстрата в активном центре, а также для дестабилизации S или стабилизации S^*. Способность фермента реагировать с одним субстратом быстрее, чем с другим («селективность») непосредственно зависит от того, насколько энергия связывания благоприятствует осуществлению каталитической стадии. Аминокислотные остатки около активного центра, не участвующие непосредственно в катализе, зачастую способствуют катализу благодаря использованию энергии связывания.

6.2.4.2.2. Сближение

Этот механизм лучше всего описывает процесс катализа, когда каталитические центры и субстрат находятся в непосредственной близости друг от друга и имеют соответствующую пространственную ориентацию, способствующую осуществлению реакции. Иными словами, если реагенты находятся внутри активного центра фермента, их «эффективные концентрации» значительно превосходят концентрации в растворах. Этот механизм предполагает «энтропийный вклад» в катализ, позволяющий преодолеть значительное уменьшение энтропии в ходе реакции. Таким образом, эффекты сближения в катализе зачастую можно моделировать, используя эффективные (повышенные) концентрации с учетом влияния концентрации на скорость реакций.

Время жизни межмолекулярных ассоциатов между сталкивающимися в растворе реагентами обычно на 6 порядков меньше времени жизни типичного комплекса «субстрат–фермент» [138]. Наличие у фермента связывающего «кармана» позволяет удерживать (путем «стыковки» или «заякоривания», *anchoring*) субстрат в активном центре при сниженной концентрации воды. Чем больше время взаимодействия, тем выше вероятность достижения переходного состояния. Таким образом, моделью сближения может быть внутримолекулярная реакция, в которой все реагенты рассматриваются как существующие *внутри* одной молекулы (фермента), а не межмолекулярная реакция.

Каталитический эффект сближения, рассчитываемый в основном теоретически, приводит к повышению скорости химической реакции с участием от одного до трех субстратов в 104–1015 раз (для многосубстратных реакций даже еще больше) [138, 141]. Сближение представляет собой механическое свойство, не связанное с той или иной аминокислотой и зависящее от химической и физической природы активного центра и сочетания аминокислот, которые его образуют (см. табл. 6.2).

6.2.4.2.3. Ковалентный катализ

При этом механизме образуются промежуточные ковалентные интермедиаты «фермент–субстрат» или «кофактор–субстрат». Началом такого катализа является нуклеофильная или электрофильная атака (отметим, что такая стадия может быть и при нековалентных механизмах). Нуклеофильные центры богаты электронами или обладают неспаренными электронами, иногда они отрицательно заряжены и вступают во взаимодействия с электронодефицитными центрами (ядрами) — например, углеродом карбонильной группы, фосфорильной или гликозильной функциональными группами. Электрофильный катализ предполагает взаимодействие электрофилов («резервуаров» электронов) с электронами реакционных центров. Поскольку в ковалентный катализ вовлечены и нуклеофильные, и электрофильные группы реагентов, разделение этого вида катализа на два типа зависит от того, какой именно центр инициирует реакцию.

Образование ковалентного интермедиата предполагает существование, по крайней мере, двух стадий реакции, а именно образования и распада ковалентного аддукта (*Enz-Nu-*P_2), причем каждой стадии соответствует свое значение $\Delta G^{\ddagger}$ (рис. 6.3). Наличие нескольких стадий катализа также отражает присутствие нескольких форм ферментов (этому случаю соответствует кинетически более сложная картина, чем приведенная на рис. 6.1). Ковалентный катализ характерен для многих классов ферментов, включая сериновые и тиольные протеазы, липазы и карбоксилэстеразы, а также многие гликозилгидролазы. Ковалентный катализ приводит к повышению скорости реакции в 100–1000 раз.

Нуклеофильный катализ. Аминокислотные остатки ферментов с нуклеофильными центрами приведены в табл. 6.2. Как правило, нуклеофильность зависит от основности функциональной группы, обусловленной способностью отдавать пару электронов протону [28, 41]. Таким образом, константа скорости нуклеофильной реакции положительно коррелирует с pK_a структурно родственных соединений (чем больше pK_a, тем выше скорость реакции). Нуклеофильные группы ферментов, однако, должны зачастую функционировать в узком интервале значений pH (обычно вблизи pH 7), в котором ферменты наиболее стабильны. Так, хотя *ARG* имеет сильноосновную функциональную группу, ее pK_a (около 12) не способствует протеканию нуклеофильной реакции, поскольку он существует в ферментах почти исключительно в форме сопряженной (конъюгированной) кислоты.

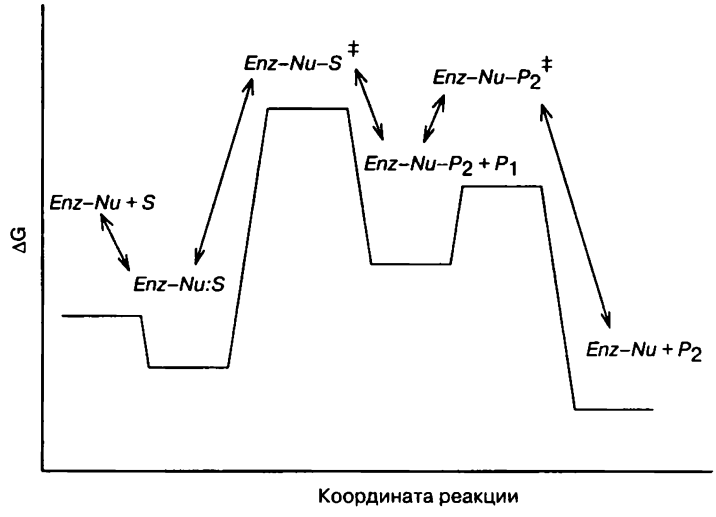


Рис. 6.3. Координата ферментативной реакции в случае нуклеофильного катализа и образования ковалентного интермедиата: *Enz-Nu* — фермент с нуклеофильной каталитической группой; *S* — субстрат; P_x — продукты реакции

Именно поэтому аргинин не включен в табл. 6.2. Еще одним фактором, влияющим на скорость нуклеофильного катализа, является природа отщепляемой группы или продуктов, возникающих при образовании ковалентного интермедиата (P_1 на рис. 6.3). Чем меньше основность (или pK_a) отщепляемой группы, тем выше скорость реакции с участием данного нуклеофила.

Одним из наиболее известных примеров нуклеофильного катализатора является каталитическая триада *HIS–ASP(GLU)–SER*, характерная для сериновых протеаз, липаз и карбоксилэстераз. Указанные ферменты катализируют гидролиз амидной (пептидной) и эфирной связей с образованием ковалентного интермедиата. Действие каталитического центра *HIS–ASP–SER* показывает также, что хотя механизм этого процесса (в данном случае нуклеофильного катализа) рассматривается как пример какого-то одного типа реакций, на деле в катализе участвуют взаимодействия разной природы. В случае каталитической триады субтилизина (протеазы *B. subtilis*, ЕС 3.4.21.62) аминокислота SER_{221} действует как нуклеофил — донор электронов в реакции с амидным углеродом пептидной связи (рис. 6.4) [20, 21].

Нуклеофильность атома кислорода SER_{221} повышается под действием HIS_{64}, действующего как акцептор протона; соседний остаток ASP_{32} стабилизирует возникающий на HIS_{64} заряд. Это сопровождается образованием промежуточного тетраэдрического ацил-ферментного интермедиата. На заключительной стадии HIS_{64}, действуя как общая кислота, отдает протон N-терминальному пептидному фрагменту распадающегося пептида, составляющего отщепляемую группу; при этом образуется ковалентный ацил-ферментный аддукт. В конце каталитического цикла вода, действуя как терминальный нуклеофил, входит в активный центр и замещает пептидный фрагмент из SER_{221}, образуя другой тетраэдрический интермедиат аналогичным вышеописанному способом (на рис. 6.4 не показан). Остаток ASN_{155} менее важен для катализа, но он стабилизирует образующийся тетраэдрический интермедиат (оксианион) в месте, которое называют «оксианионной дырой».

Поведение мутантных субтилизинов (в которых специфичные отдельные аминокислотные остатки замещены на другие методами молекулярной технологии) выявило значение аминокислот, составляющих триаду. Природный фермент имеет каталитическую активность $k_{кат}/K_M$ (см. раздел 6.2.5.3) $1{,}4 \times 10^5$ (табл. 6.3) [20, 21]). Если на *ALA* какой-нибудь из остатков SER_{221}, HIS_{64} или ASP_{32} замещен, то каталитическая активность снижается в 10^4–10^6 раз. Если замещены любые два или все три остатка на *ALA*, то эффект будет тот же. Это свидетельствует, что указанные три аминокислотных остатка действуют как единое целое, а не как сумма единиц, каждая из которых обладает своей каталитической активностью. Те же аминокислоты составляют каталитическую триаду липаз (и большинства карбоксилэстераз). Для липаз последовательность стадий аналогична показанной на рис. 6.4 с той разницей, что субстрат представляет собой эфир (R–CO–OR'), ацильная (R–CO–) группа которого образует тот же ацил-ферментный интермедиат, однако отщепляемой группой является спирт (R'OH). Каталитическая триада *HIS–ASP(GLU)–SER* характерна для липаз и карбоксилэстераз, тогда как функционирование протеаз может протекать по любому из четырех каталитических механизмов (см. раздел 6.3.3). Тремя карбоксилэстеразами, использующими

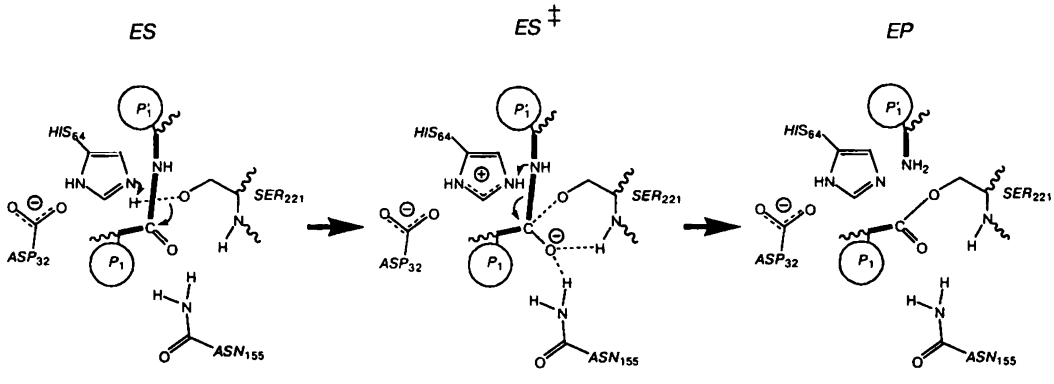


Рис. 6.4. Механизм действия сериновых протеаз. Пептидный скелет субстрата обозначен жирными линиями. Группы P_1 и P'_1 представляют собой боковые цепи аминокислот с N- и С-терминальными участками распадающейся связи. По [20, 21]

Таблица 6.3

Влияние точечных мутаций на каталитические константы протеазы субтилизина. По [20, 21]

Мутации фермента	$k_{кат}$, $с^{-1}$	K_M, мкМ	$k_{кат} / K_M$, $с^{-1} \cdot м^{-1}$
«Дикие» мутации	$6{,}3 \cdot 10^{1}$	440	$6{,}3 \cdot 10^{5}$
$SER_{221} \rightarrow ALA$	$5{,}4 \cdot 10^{-5}$	650	$8{,}4 \cdot 10^{-2}$
$HIS_{64} \rightarrow ALA$	$1{,}9 \cdot 10^{-4}$	1300	$1{,}5 \cdot 10^{-1}$
$ASP_{32} \rightarrow ALA$	$1{,}8 \cdot 10^{-2}$	1400	$1{,}3 \cdot 10^{1}$
Все три мутации	$7{,}8 \cdot 10^{-3}$	730	$1{,}1 \cdot 10^{-1}$

другие каталитические единицы и механизмы, являются секреторная фосфолипаза A_2 (панкреатическая, яда пчел и змей; дипептид *HIS/ASP*), липидная ацилгидролаза картофеля (дипептид *ASP/SER*) и пектинметилэстераза (дипептид *ASP/ASP*).

Электрофильный катализ представляет собой другой тип ковалентного механизма, характерной стадией которого при координировании является электрофильная атака. Аминокислотные остатки ферментов не содержат электрофильных групп — они возникают в электронодефицитных кофакторах или катионных азотсодержащих производных, образуемых субстратами и каталитическими фрагментами ферментов при инициировании электрофильного катализа (см. табл. 6.2).

Одним из наиболее известных примеров ферментативного электрофильного катализа являются реакции, в которых пиридоксальфосфат (эссенциальный витамин B_6, см. главу 7) участвует как кофактор; многие такие ферменты участвуют в превращениях и метаболизме аминокислот [41, 128]. Механизм реакций, катализируемых пиридоксальзависимыми ферментами, включает стадию переноса (трансальдиминирования) шиффова основания (–C=N–), связанного с пиридоксалевым, от лизинового остатка фермента к реакционноспособной аминокислоте его активного центра фермента (рис. 6.5, *a*) [41, 128]). Промежуточные шиффовы основания стабилизируются пиридиновым кольцом, играющим роль резервуара электронов. Остаток фермента, действуя затем как основание, принимает протон от субстрата, что является типичной первой стадией реакции. Отщепление или перенос группы, находящейся около хирального центра (–R, –H, $–COO^-$), более предпочтительно, поскольку заместитель при α-C атоме располагается перпендикулярно плоскости пиридиниевого интермедиата (при этом E_a для процесса трансформации или отщепления минимальна, рис. 6.5, *b*).

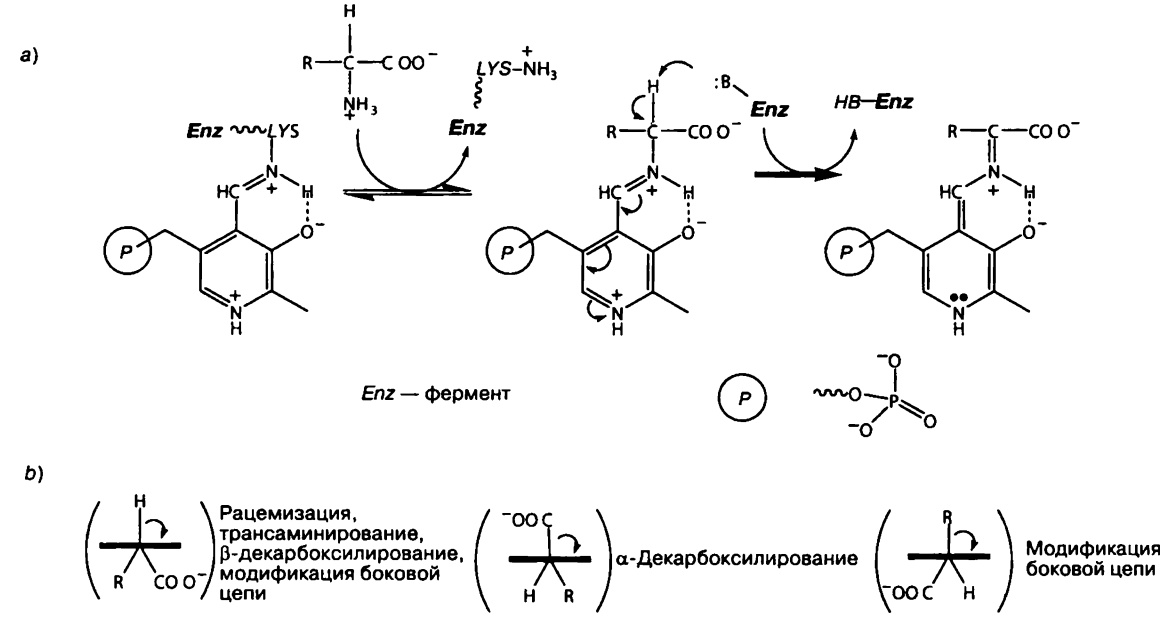


Рис. 6.5. Механизм действия пиридоксальсодержащих ферментов: *a* — начальные стадии трансальдиминирования и удаления α-H атома; *b* — типы каталитических реакций в зависимости от конфинурации при α-C-атоме. По [41, 128]

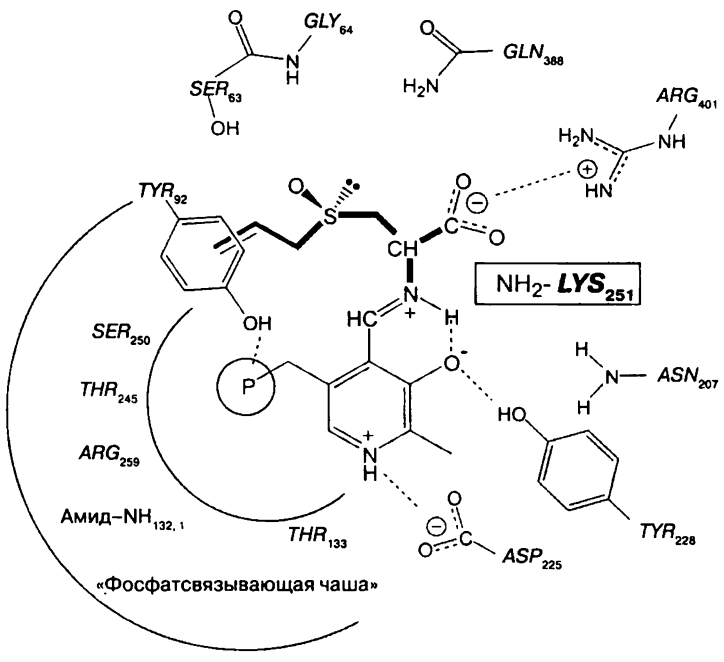


Рис. 6.6. Активный центр аллииназы чеснока. Полужирными линиями выделен скелет субстрата (+)*S*-аллил-*L*-цистеинсульфоксида. По [64]

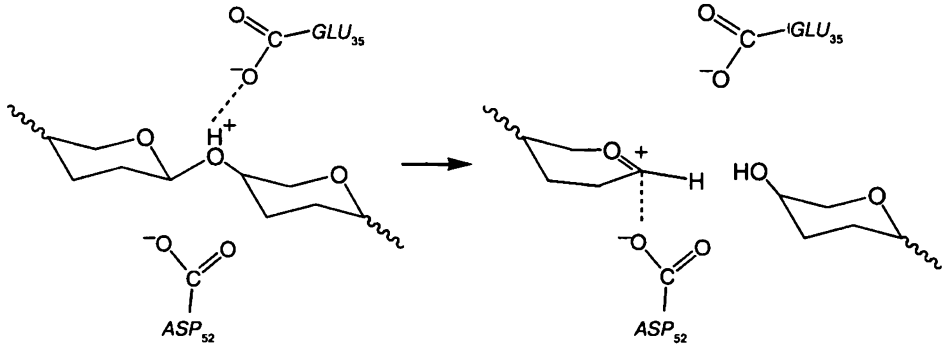
Активный центр, характерный для многих пиридоксалевых ферментов, показан на рис. 6.6 на примере аллиинлиазы (ЕС 4.4.1.4, *S*-алк(ен)ил-*L*-цистеинсульфоксидлиазы) [64]. Этот фермент, обусловливающий возникновение специфического запаха при раздавливании или резке свежих овощей рода *Allium* (лук, чеснок, лук-порей, лук-резанец и др.), зачастую упрощенно называют аллииназой. Аминокислотные остатки LYS_{251} в ферменте чеснока, LYS_{285} в ферменте лука и LYS_{280} в ферменте лука-резанца координируются с пиридоксалевым коферментом, поддерживая так называемую «фосфатсвязывающую чашу», в образовании которой участвуют также азот и гидроксильные группы пиридинового кольца [64]. Субстрат координируется с другими участками фермента (ARG_{401}, SER_{63} и GLY_{64} амидом, а также с TYR_{92}), обеспечивая стереоселективность фермента относительно (+) S-алкил-*L*-цистеинсульфоксидов. Аллииназа вызывает β-расщепление субстрата с образованием сульфеновой кислоты (R– S– OH легко отделяемой группы).

6.2.4.2.4. Общий кислотно-основный катализ

Большинство ферментативных реакций включают стадии переноса протона (при трансформации в переходное состояние). Эти стадии зачастую связаны с аминокислотными остатками, выступающими в роли кислот (доноров протона) и оснований (акцепторов протона). Общий кислотно-основный катализ может отличаться от специфического кислотного (за счет H_3O^+) или основного (за счет OH^-) катализа, так как скорости реакций в случае общего кислотно-основного катализа зависят от концентрации катализатора. Для ферментов характерны механизмы общего кислотно-основного катализа, поскольку они неспособны концентрировать H_3O^+ или OH^- (отметим, однако, что некоторые ферменты могут генерировать H^+ или OH^- в активных центрах). Для аминокислотных остатков ферментов, имеющих свойства общих кислот и оснований (см. табл. 6.2), обычно характерны значения pK_a вблизи оптимума pH ферментативной активности и стабильности фермента (pH 4–10). Напомним, что общий кислотно-основный катализ вносит вклад в нуклеофильный механизм каталитических реакций сериновых протеаз, липаз и карбоксилэстераз (см. рис. 6.4). И действительно, *HIS* очень часто вовлечен в кислотно-основной катализ, так как pK_a имидазольной группы в белках обычно находится в пределах 6–8, что идеально подходит для его функционирования и *как кислоты, и как основания* в оптимальных для многих ферментов условиях.

Примером общего кислотно-основного катализа могут служить реакции, катализируемые лизоцимом (ЕС 3.2.1.17, мукопептидом *N*-ацетилмурамилгидролазой, называемым также мурамидазой) — ферментом, входящим в состав слюны, выделений слезных протоков и белка куриных яиц. Механизм действия лизоцима характерен и для других гликозилгидролаз (см. раздел 6.3.2), в том числе катализирующих превращения крахмала, сахаров и пектинов [116]. Лизоцим можно использовать в качестве бактерицидного агента пищевых продуктов, поскольку он гидролизует пептидогликановые гетерополимеры клеточных стенок прокариотов, особенно грамположительных микроорганизмов, в том числе многих пищевых патогенов. Механизм действия лизоцима, эффективнее всего реализующийся при pH около 5, основан на

общей кислотно-основной природе аминокислот GLU_{35} и ASP_{52}, входящих в активный центр (схема реакции 6.8) [32, 116, 141].



(6.8)

Протон GLU_{35} действует как общая кислота и координируется с атомом кислорода разрывающейся гликозидной связи; карбоксилат ASP_{52} электростатически стабилизирует образующийся карбокатион (карбоксоний-катион) субстрата, действуя как основание*. Необходимая для завершения гидролиза вода (на схеме не показана) частично ионизирована карбоксилатной группой GLU_{35}, что способствует присоединению OH^- (из воды) к хлору исходного гликозида, при этом протон H+, приобретенный GLU_{35}, возвращает фермент в активное состояние. Исключение воды и наличие гидрофобных остатков в активном центре фермента создает неполярную среду вблизи GLU_{35}, делая его менее склонным к ионизации и изменяя pK_a до аномально высокого значения 6,1. Это приводит к тому, что при pH 5 катализатор действует как общая кислота. Относительная нехватка воды, экранирующей заряды, также дает возможность диполям расположиться между каталитическими участками и образующимся промежуточным карбоксоний-катионом. Это приводит к понижению E_a на более чем 9 ккал/моль, что соответствует повышению скорости реакции по сравнению с некаталитической реакцией в водной среде более чем в 10^6 раз [32].

Примером процессов с переносом протона (атома водорода) являются реакции, катализируемые ксилозоизомеразой (EC 5.3.1.5, *D*-ксилозокетолизомеразой) и глюкозоизомеразой. Этот фермент катализирует реакцию равновесия между изомерами альдоз и кетоз. Почти все ксилозоизомеразы являются гомотетрамерами с двумя активными центрами, каждый из которых имеет катионный кофактор (обычно Mg^{2+}, но могут быть также Mn^{2+} и Co^{2+}) [141]. Аминокислоты, формирующие активный центр (в *Streptomyces spp.*), включают остатки, связывающие катионы ($GLU_{180,216}$, $ASP_{244,254,256,286}$, HIS_{219}), и ряд других (HIS_{53}, PHE_{93}, TRP_{135}, LYS_{182}, GLU_{185}) [116]. Активный центр разделен на высокополярную и гидрофобную области (особенно TRP_{135}), причем последняя служит для удаления воды. Исторически реакции с участием этого фермента рассматривались как пример общего кислотно-основного катализа, однако в настоящее время их относят к реакциям гидридного переноса. Реакция протекает через следующие стадии: открытие цикла, скорость-лимитирующая стадия переноса водорода и закрытие цикла [46, 47]. Из двух ионов Mg^{2+} структурную функцию выполняет Mg_s^{2+}, который координируется с атомами O2 и O4 углеводного субстрата, а Mg_c^{2+} участвует в катализе (рис. 6.7) [46, 47]. После открытия цикла (на рисунке эта стадия не показана) из воды под действием ASP_{256} карбоксилата (общего основания, удаляющего H^+) образуется OH^- Протон от O2 переносится на OH^--группу, связанную с Mg_c^{2+}, после чего Mg_c^{2+} притягивается к отрицательно заряженному O2 (Mg_c^{2+} фактически *перемещается*), стабилизируя переходное состояние. Это способствует образованию водородной связи между LYS_{182} и O1. Перемещение Mg_c^{2+} происходит синхронно с переносом гидрида ($:H^-$) от C2 к C1. Рассматриваемая реакция является реакцией равновесия, поскольку гидридный перенос может проходить и в обратном направлении через те же стадии с участием Mg_c^{2+} и OH^-, в результате чего H^+ переходит от O1 к O2 алкоксидов, способствуя переносу гидрида от C1 к C2.

* Многие реакции с участием гликозилгидролаз, в том числе лизоцима, рассматриваются как примеры нуклеофильного катализа, поскольку образуется ковалентный интермедиат [116], не показанный на схеме 6.8. Карбоксилат ASP_{52} является хорошим нуклеофилом (см. табл. 6.2). Механизмы действия гликозилгидролаз рассмотрены в разделе 6.3.2. — *Примеч. авт.*

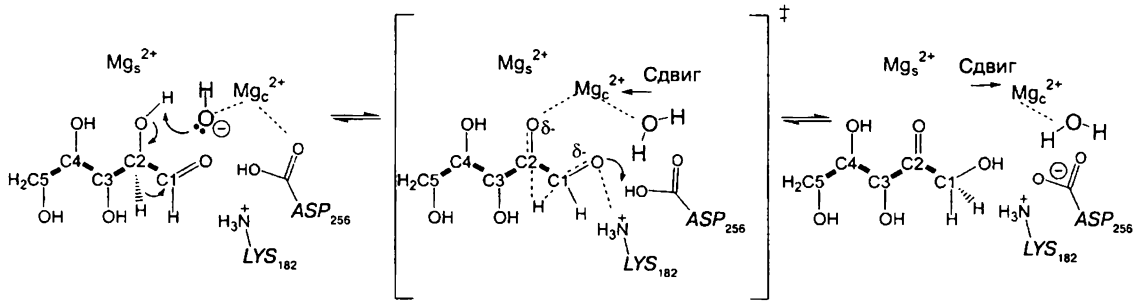


Рис. 6.7. Механизм действия ксилозо(глюкозо)изомеразы. По [46, 47]

Общий кислотно-основный катализ, в ходе которого происходит притягивание или отталкивание электронов вдоль координаты реакции, обычно приводит к ускорению реакции в 100–1000 раз. Значительно большее увеличение скорости в случае лизоцима объясняется действием других факторов — электростатической стабилизацией и напряжением субстрата.

6.2.4.2.5. Напряжение и искажение

Этот механизм основан на предположении, что взаимодействующие домены субстратов и ферментов не являются жесткими, как предполагается в концепции «ключ–замок», предложенной Э. Фишером в 1894 г. Рассматривать искажение или напряжение как факторы, способствующие катализу, предложили Дж. Б. С. Холдейн и Л. Полинг. Известно, что хотя между ферментом и субстратом и существует структурное соответствие, оно не является совершенным. В противном случае катализ был бы маловероятен из-за большого энергетического барьера, требующегося для достижения переходного состояния (см. рис. 6.2, *b*).

Для распознавания субстрата, приобретения энергии связывания и ориентации субстрата в активном центре необходима некоторая предварительная комплементарность между субстратом и ферментом. Энергия связывания фермента и субстрата может проявляться в их напряжении или искажении, что способствует достижению большего соответствия. При этом длина связей и углы между ними не меняются, так как для этого необходима большая энергия [41]. Напряжение проявляется в ограничении свободы вращения, стерическом сжатии и электростатическом отталкивании между ферментом и субстратом. Таким образом, в физическом смысле присоединение субстрата к ферменту можно рассматривать как своего рода «стресс» (при котором искажения не происходит) по аналогии с тем, что наблюдается при использовании энергии связывания для достижения переходного состояния. Примером проявления эффектов такого рода является действие лизоцима, при котором карбоксоний-катион пиранозного производного в переходном состоянии (см. схему реакции 6.8) находится в виде «полукресла» («софы»), а не в более стабильной форме кресла.

Поскольку ферменты — это белки, у них более гибкая структура, чем у малых (не)органических соединений. С учетом конформационной гибкости белков Д. Кошланд (*D. Koshland*) выдвинул гипотезу «индуцированного соответствия», по которой конформационные возмущения в активном центре фермента, вызванные связыванием субстрата, рассматриваются как способствующие стабилизации комплекса $ES^{\ddagger}$. Такая конформационная перестройка активного центра *при связывании с субстратом* может подстраивать реакционные группы как фермента, так и субстрата друг к другу для улучшения условий осуществления каталитической реакции.

Примером механизма индуцированного соответствия может служить поверхностная активация липаз, при которой белковый домен, образующий своего рода «крышку», закрывающую активный центр, претерпевает конформационное изменение. Это дает возможность субстрату (эфиру жирной кислоты) приблизиться к активному центру и гидролизоваться. К примерам более «тонкого» молекулярного движения в ферментах относится описанное выше (см. рис. 6.7) перемещение Mg_c^{2+} в ксилозоизомеразе, приводящее к увеличению скорости реакции примерно в 10^4 раз [47]. Третьим примером индуцированного соответствия является папаин (сульфгидрилпротеаза), в котором стерически индуцированное напряжение,

вызванное присоединением субстрата, облегчается благодаря образованию тетраэдрического интермедиата (см. разделы 6.2.6 и 6.3.3). Очевидно, что многие ферменты (если не большинство) при осуществлении каталитической функции в той или иной степени претерпевают индуцированные изменения. Хотя количественно определить увеличение скорости каталитической реакции, вызванное напряжением фермента, довольно сложно, такое увеличение оценивается в пределах от 10^2 до 10^4.

6.2.4.2.6. Прочие механизмы действия ферментов

Редокс-ферменты (оксидоредуктазы) катализируют реакции электронного переноса за счет циклического изменения редокс-состояния простетических групп. К этим группам относятся ионы металлов переменной валентности (железа или меди), а также кофакторы — флавины (никотинамиды, в том числе *NAD*(P)H), являющиеся косубстратами в окислительно-восстановительных реакциях). В липоксигеназе (линолеат:кислород оксидоредуктазе, ЕС 1.13.11.12), широко распространенной в растительных и животных тканях, в роли простетической группы выступает негемовое железо. Оно реагирует с жирными кислотами, имеющими 1,4-пентадиеновую группу, например, с линолевой ($C18:2_{9c,12c}$). Липоксигеназы инициируют окислительную деградацию жирных кислот с образованием соединений с нежелательным (прогорклым) или нежелательным запахом, а за счет вторичных реакций они могут также обесцвечивать пигменты. Липоксигеназу зачастую выделяют из тканей хозяина в «неактивном» $Fe^{(II)}$ состоянии (рис. 6.8) [14, 22]). Активация происходит путем реакции с пероксидом (присутствующим в низких концентрациях во всех биологических тканях), что приводит к образованию комплекса HO-$Fe^{(III)}$ с координированной гидроксидной группой — основанием, которое в процессе «туннелирования»* отнимает атом H от метиленового углерода (эти C–H связи в жирных кислотах характеризуются наименьшей энергией и поэтому наиболее реакционноспособны). Свободнорадикальный аддукт стабилизирован за счет резонанса, и молекулярный кислород присоединяется к алкильному радикалу в доступном месте, противоположном иону железа (см. раздел 6.2.6). Полученный пероксильный радикал отнимает атом H от неактивной H_2O–$Fe^{(II)}$-простетической группы с образованием гидропероксида жирной кислоты (в случае липоксигеназы сои — гидропероксида 13-S-линолевой кислоты), и фермент возвращается в активное состояние.

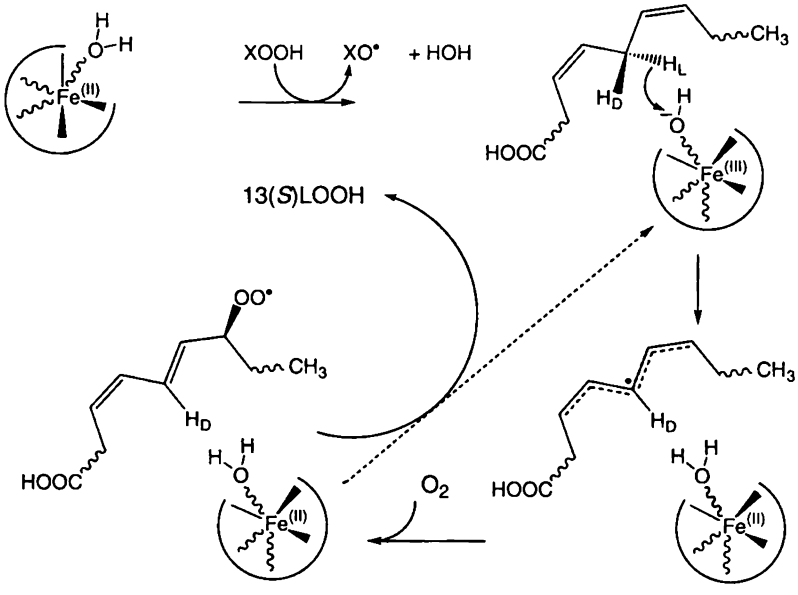


Рис. 6.8. Механизм действия липоксигеназы. По [14, 22, 117]

* Туннелирование — это механизм (моделирующийся как трансмисионный коэффициент), описывающий перенос H с энергией менее энергетического барьера («нырок под барьер»), в том числе двумя неразделимыми частями — сначала ядро, затем электрон [47]. — *Примеч. авт.*

6.2.4.2.7. Суммарное каталитическое действие ферментов

Различные комбинации механизмов каталитического действия ферментов приводят в целом к увеличению скорости реакций по сравнению с некаталитическими реакциями в 10^{17}–10^{19} раз [47, 96, 141]. Основной причиной этого увеличения является стабилизация переходного состояния (снижение энергии активации); несколько меньшую роль играет процесс туннелирования (особенно на стадиях переноса атома водорода).

6.2.5. Кинетика ферментативных реакций

Описанные выше механизмы ферментативного катализа объясняют превращения субстратов, но ничего не говорят о том, *насколько быстро* протекают ферментативные реакции. Так как ферменты используются для ускорения реакций, способствующих улучшению качества пищевых продуктов, при принятии решения об использовании тех или иных ферментов очень важно знать, как быстро протекают реакции с их участием. Кроме того, при выборе фермента необходимо знать, насколько селективно он действует по отношению к данному субстрату. Скорость любой реакции как ферментативной, так и неферментативной, зависит как от внутренних кинетических факторов, связанных с энергией активации (см. рис. 6.1 и 6.2), так и от концентраций реагентов и катализатора (эффекты действия масс). Поскольку эти концентрации варьируют в широких пределах, очень важно сравнивать относительную каталитическую активность на основе таких внутренних факторов, как кинетические константы. Если при заданных условиях известны *константы скорости* реакции, то *можно предсказать значения скорости* для любой комбинации концентраций реагентов и катализатора в этих условиях.

6.2.5.1. Простые модели ферментативных реакций

Кинетика ферментативных реакций существенно отличается от кинетики других химических процессов [30, 113]. Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию — модель быстрого равновесия, кинетика которой была описана Михаэлисом и Ментен (модель Михаэлиса–Ментен), когда фермент (E) взаимодействует с одним субстратом (S), образуя единственный комплекс (ES), называемый иногда комплексом Михаэлиса, который затем превращается в единственный продукт (P):

$$E + S \underset{k_1}{\overset{k_{-1}}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow[k_{кат}]{} E + P \tag{6.9}$$

Предполагается, что связываение S с E представляет собой равновесное состояние между стадиями ассоциации ($E + S \rightarrow ES$) и диссоциации ($ES \rightarrow E + S$), характеризующимися соответствующими константами скорости второго (k_1) и первого (k_{-1}) порядка. Биохимическое превращение принято представлять как равновесное связывание и диссоциативный процесс, поэтому константа равновесия записывается следующим образом:

$$\frac{[E]\times[S]}{[ES]} = \frac{K_{-1}}{k_1} = K_S \text{ (константа диссоциации или сродства).} \tag{6.10}$$

Чем меньше K_S, тем больше фермента существует в форме ES и тем больше связывание или сродство между E и S. Вторая стадия реакции $ES \rightarrow E + P$ является каталитической и характеризуется константой скорости первого порядка $k_{кат}$. Таким образом, начальную скорость реакции (v) можно представить как

$$v = dP/dt = k_{кат}[ES], \tag{6.11}$$

причем предполагается, что образование P не нарушает равновесие между E и S, то есть для описания ферментативной кинетики используется модель быстрого равновесия.

Другой кинетический подход, предложенный Д. Бриггсом и Д. Холдейном, предполагает, что на скорость распада ES с образованием P может влиять пропорция или распределение фермента между свободным E и ES. В этом случае $[ES]$ в ходе реакции не меняется или меняется очень мало, то есть ES находится в квазистационарном состоянии:

$$d[ES]/dt \approx 0. \tag{6.12}$$

Таким образом, скорости образования и распада ES одинаковы. Так как ES образуется при связывании S и E (константа скорости $k1$), а исчезает в ходе реакций с константами скорости $k{-}1$ и $k_{кат}$, можно записать:

$$k_1[E] \times [S] = (k_{-1} + k_{кат})[ES]. \tag{6.13}$$

Это выражение можно преобразовать в уравнение процесса диссоциации:

$$\frac{[E]\times[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{кат}}{k_1} = K_м \text{ (константа Михаэлиса)}. \tag{6.14}$$

Уравнение (6.14) аналогично уравнению (6.10), за исключением того, что $[ES]$ зависит и от реакции диссоциации, и от каталитической реакции. Соотношение между K_S (уравнение 6.10) и $K_м$ (уравнение 6.14) зависит от значений k_{-1} и $k_{кат}$. Если $k_{кат}$ примерно в сто раз меньше, чем k_{-1}, то константой $k_{кат}$ можно пренебречь, и распределение фермента между E и ES зависит *только* от константы связывания, и $K_м$ становится эквивалентной K_S. С другой стороны, если $k_{кат}$ примерно равна k_{-1}, то определяемое константой связывания распределение фермента между E и ES никогда не будет реализовано, поскольку каталитическая стадия протекает достаточно быстро, и концентрация ES не достигает равновесного состояния. В этом случае $K_м \neq K_S$, и $K_м$ просто не отражает сродства. Кинетика таких реакций описывается квазистационарными моделями. $K_м$ — это константа псевдодиссоциации ES и имеет размерность молярности (M), как S и K_S. Это дает возможность сравнивать $K_м$ и $[S]$ непосредственно (использование этого сопоставления мы рассмотрим далее). Если $k_{кат} >> k_{-1}$, то $k_{кат}/K_м = k_1$, и стадией, определящей скорость реакции, является стадия ассоциации. Поскольку константы скорости ассоциации зачастую равны ~10^7–10^8 $с^{-1} \cdot М^{-1}$, существование условий квазистационарности можно определить по величине $k_{кат}/K_м$ — она должна быть равна 10^6–10^8 $с^{-1} \cdot М^{-1}$ [41, 138]. Квазистационарными моделями описываются многие ферментативные реакции, катализирующие процессы окисления–восстановления и изомеризации, однако для реакций большинства (но не всех) гидролитических ферментов эти модели неприменимы (для этих ферментов $K_м = K_S$, и $K_м$ есть мера сродства).

6.2.5.2. Уравнения скорости ферментативных реакций

Разделим уравнение скорости ферментативной реакции (6.11) на уравнение для общей концентрации фермента ($[E_т] = [E] + [ES]$):

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k_{кат}\times[ES]}{([E]+[ES])}. \tag{6.15}$$

Это уравнение существенно упрощается, если записать уравнение (6.14) как $[E] = (K_M \times [ES])/[S]$ и подставить его в уравнение (6.15). Полагая, что скорость ферментативной реакции максимальна тогда, когда весь фермент присутствует в форме ES, запишем:

$$V_{max} = k_{кат} \times [E_T] \tag{6.16}.$$

Уравнение (6.15) теперь можно записать в виде

$$v = \frac{V_{max}\times[S]}{(K_M + [S])}. \tag{6.17}$$

Полученное уравнение важно во многих отношениях. Поскольку V_{max} и $K_м$ являются константами, уравнение (6.17) можно представить в виде

$$y = \frac{ax}{(b+x)}. \tag{6.18}$$

Это уравнение (где a и b — константы) представляет собой уравнение гиперболы в прямоугольных координатах, и поэтому кинетика простых ферментативных реакций зачастую является гиперболической.

Из уравнения (6.17) следует, что скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата. При малых [S], K_M>>[S], уравнение (6.17) превращается в уравнение (6.19):

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M}. \tag{6.19}$$

Таким образом, когда [S] является лимитирующей или при бесконечном разбавлении скорость реакции характеризуется сложной const = V_{max}/K_M, наблюдается реакция первого порядка по отношению к [S], и уравнение ферментативной реакции для низких [S] можно записать как

$$E + S \xrightarrow{V_{max}/K_M} E + P. \tag{6.20}.$$

Эта модель описывает способность фермента распознавать и превращать субстрат в разбавленных растворах, а константа V_{max}/K_M, называемая «константой специфичности», является мерой «каталитической эффективности» фермента. Количественное сравнение величин V_{max}/K_M для реакций фермента с разными субстратами дает возможность охарактеризовать селективность фермента, позволяющую оценить, как фермент «узнает» субстрат (см. раздел 6.2.6). Так как V_{max}/K_M = const, выводы о селективности можно делать независимо от того, какова концентрация конкурирующих субстратов. В другом предельном случае, если ([S] >> K_M), уравнение (6.17) принимает вид

$$v = V_{max} \tag{6.21},$$

то есть скорость реакции не зависит от [S] (нулевой порядок по [S]), фермент «насыщен» субстратом, и ферментативную реакцию при этих условиях можно записать следующим образом:

$$ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P. \tag{6.22}$$

Следовательно, при [S] >> K_M скорость реакции зависит только от [E_T] (ср. уравнение 6.16). Кинетические исследования при этих концентрационных условиях дают представление об активности ферментов.

Кинетика ферментативных реакций отнюдь не всегда описывается моделью Михаэлиса–Ментен. Причинами этого могут быть ингибирование субстратом, присутствие в субстрате эндогенного ингибитора, а также наличие нескольких ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию. В этих случаях для описания кинетики ферментативных реакций используют другие модели [30, 113]. В любом случае величину K_M следует использовать только тогда, когда применима модель Михаэлиса–Ментен, а в других ситуациях лучше использовать величины $S_{0,5}$ и $K_{0,5}$.

Для описания поведения ферментов в пищевых системах другие кинетические модели применяются довольно редко, и в этой главе мы их рассматривать не будем. Тем не менее, они важны для описания бисубстратных реакций с принудительным или случайным внесением субстратов и/или продуктов, а также равновесных реакций и реакций с участием аллостерических ферментов [30, 113].

6.2.5.3. Графический анализ ферментативных реакций

Скорость ферментативной реакции в условиях, отличных от предельных (насыщение или бесконечное разбавление S), можно найти по известным относительным значениям V_{max}, K_M и S; две последние величины имеют размерность молярности, так что S можно выразить величиной, кратной K_M (xK_M). Разделив обе части уравнения (6.17) на V_{max}, получим:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{xK_M}{(K_M + xK_M)}. \tag{6.23}$$

Путем подстановки численных значений (1, 2, 3, и 0,5, 0,33, 0,2, ...) вместо «x» в уравнении (6.23), можно получить типичное уравнение кинетики ферментативных реакций как функции [S] или [S]/K_M (уравнение гиперболы в прямоугольных координатах; см. рис. 6.9, где одна асимптота — это V_{max}, а другая представляет собой значение S/K_M – 1). Из этого графика видно, как реакция становится реакцией первого порядка по [S], а тангенс угла наклона касательной при бесконечном разбавлении [S] — равным V_{max}/K_M,

как это предсказывает уравнение (6.19). При увеличении [*S*] порядок реакции приближается к нулевому и наблюдается насыщение фермента. Построение графика дает возможность проверить, описывается ли исследуемая реакция моделью Михаэлиса-Ментен (если график не является гиперболой, то необходимо использовать более сложные модели)*.

Определение V_{max} (пропорциональной $k_{кат}$) и K_M важно для любого фермента, поскольку их величины позволяют предсказать, насколько эффективно данный фермент будет катализировать реакцию при различных концентрациях *E* и *S*. Для пищевых технологов особенно полезна интегральная форма уравнения Михаэлиса–Ментен:

$$V_{max}\ t = K_M\ \ln([S_0]/[S]) + ([S_0] - [S]), \qquad (6.24)$$

где S_0 и S — начальная концентрация и концентрация субстрата во время *t*.

Время достижения требуемой степени превращения (*X*) субстрата $[X = (S_0 - S)/S_0]$ определяется как

$$t = SX + K_M\ \ln[1/(1 - X)]/V_{max}. \qquad (6.25)$$

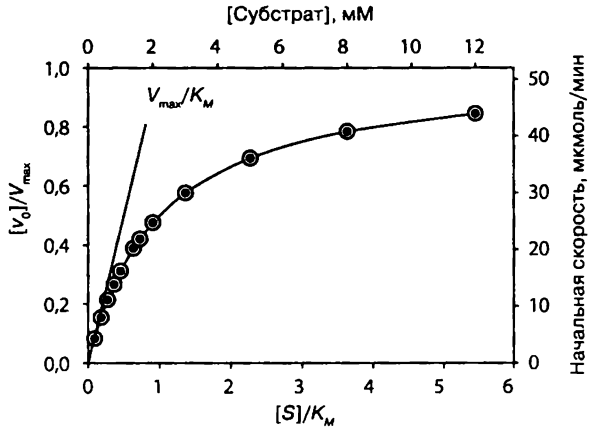


Рис. 6.9. Гиперболическая кинетика реакции по модели Михаэлиса-Ментен. Предполагается, что для реакции гипотетического фермента V_{max} = 52 мкмоль/мин и K_M = 2,2 мМ. Прямой отрезок и кривая с кружками отражают данные, представленные соответственно в координатах «левая ордината/нижняя абсцисса» и «правая ордината/верхняя абсцисса». Кривая получена с использованием нелинейного регрессионного анализа.

Это уравнение дает возможность оценить (по V_{max}), сколько фермента должно быть добавлено для превращения данного количества субстрата за данное время (что зачастую необходимо знать на практике). Оценки эти, правда, весьма приблизительны, так как на активность фермента влияют многие факторы, в том числе истощение кореагента/субстрата, ингибирование фермента продуктом, прогрессирующая дезактивация фермента, изменение условий реакции и т. п.

Константы скорости, определяемые по уравнению Михаэлиса–Ментен, имеют другой смысл. Константа скорости первого порядка $k_{кат}$ описывает только поведение *ES* и других подобных интермедиатов, а также комплекса «фермент–продукт» (*EP*). Эта константа называется также «числом оборотов» фермента. Константу Михаэлиса K_M иногда называют *кажущейся константой диссоциации*, так как она может относиться к нескольким ферментным комплексам (см. в качестве примера рис. 6.3). Здесь слово «кажущаяся» отражает то, что K_M часто определяют по зависимости *v* от [*S*], а не по непосредственному определению констант скорости k_1, k_{-1} и $k_{кат}$. K_M — это концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет ½ от V_{max} и фермент находится в состоянии «полунасыщения» субстратом. Теоретически K_M не зависит от [*E*], однако в некоторых случаях, особенно в концентрированных и сложных ферментных системах, данное положение не работает. В заключение отметим, что сопоставление K_M с [*S*] в пищевом матриксе может быть весьма показательным. Промежуточные метаболиты зачастую присутствуют в клеточных системах в концентрациях, близких к K_M. В этом случае можно тонко «управлять» ферментативной активностью за счет небольших изменений [*S*] [121]. И наоборот, если в клеточных системах $[S] >> K_M$, то это предполагает наличие какого-то барьера для реакции фермента с данным субстратом (например, физического разделения или «компартментализации»), способствующего сохранению условия $[S] >> K_M$. В то время как K_M для большинства ферментов и их субстратов находятся в пределах 10^{-6}–10^{-2} М, иногда значения некоторых K_M выходят за пределы указанного интервала — 40 мМ для глюкозооксидазы по отношению к глюкозе, 250 мМ для ксилозо(глюкозо)изомеразы по отношению к глюкозе и 1,1 М для каталазы по отношению к H_2O_2 [141]. Кажущаяся константа скорости второго порядка $k_{кат}/K_M$ (пропорциональная V_{max}/K_M) описывает свойства свободного фермента (см. уравнение (6.20)) и на-

* Кинетика многих сложных ферментативных реакций, например многосубстратных, описывается уравнением гиперболы до тех пор, пока она определяется только одним субстратом, то есть в кинетическом смысле реакция ведет себя как односубстратная или реакция псевдопервого порядка. — *Примеч. авт.*

зывается «константой специфичности». Величина этой константы в ферментной системе не может быть больше любой другой константы скорости второго порядка и представляет собой минимальное значение константы ассоциации (k_1 в уравнении(6.9)) для фермент-субстратной системы.

6.2.5.3.1. Особенности кинетического анализа ферментативных реакций

Хотя понимание кинетических характеристик ферментативных реакций весьма важно для эффективного использования и контроля ферментов в пищевых матриксах, не менее важно знать, каким способом можно наиболее точно найти кинетические константы этих реакций. Традиционным является определение зависимости скорости реакции (v) от концентрации [S] (см. рис. 6.9). За течением реакции можно следить по накоплению субстрата непрерывно или через определенные промежутки времени (рис. 6.10). Очень важно иметь уверенность, что измеряются именно «линейные» или «начальные» скорости (v_0), поскольку уравнения, выведенные по модели Михаэлиса–Ментен (и многим другим моделям), имеют смысл только для начальной концентрации субстрата [S_0], а не для текущей его концентрации [S]. На практике для этого кинетические эксперименты следует проводить в течение времени, за которое реагирует не более 5–10% от начальной концентрации субстрата [28]. Данное условие особенно важно при низких [S_0] ([S_0] < K_M), когда порядок по [S] в кинетическом уравнении приближается к первому. Даже в этом случае еще можно оценить линейную скорость или v_0, путем построения касательной или «линеаризуя» начальный участок кинетической кривой (рис. 6.10). При условии, что [S_0] >> K_M линейные зависимости соблюдаются лучше, так как порядок по [S] остается близким к нулевому даже при более чем 10%-ном превращении субстрата. Помимо осложнений, возникающих при [S] < K_M, при измерении низких скоростей реакций с использованием малочувствительных аналитических методов обычно возникают большие погрешности.

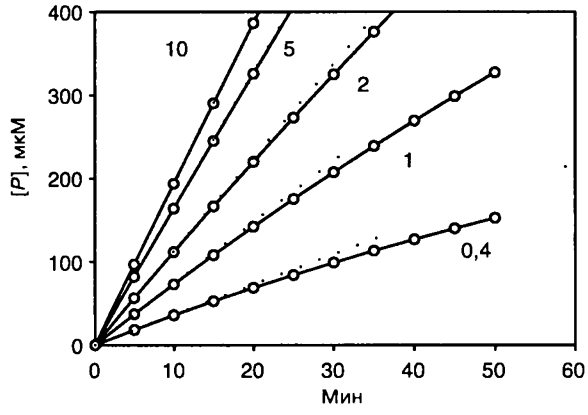


Рис. 6.10. Кинетические кривые ферментативной реакции при разных [S]. Кривым, построенным по гипотетическим параметрам, указанным в подписи к рис. 6.9, соответствуют точки и сплошные линии, а касательным к начальным участкам («линейная» часть этих кривых) — точечные линии.

6.2.5.3.2. Оценка значений K_M и V_{max}

Общепринятым способом оценки экспериментально полученных значений K_M и V_{max} является использование одного из трех линейных преобразований уравнения Михаэлиса–Ментен (уравнение 6.17, рис. 6.11). Хотя эти уравнения имеют разную форму, они математически эквивалентны и должны давать одинаковые результаты. Тем не менее, все экспериментальные данные получают с определенной погрешностью, которая может повлиять на сильные и слабые стороны каждого из линейных методов. Наиболее часто и неправильно используемым линейным преобразованием является двойная обратная зависимость Лайнуивера–Берка [44, 54]. Основное ограничение метода Лайнуивера–Берка — это большая роль данных при малых [S], определяемых с наибольшей погрешностью; эта неопределенность (ошибка по оси y) еще больше увеличивается из-за использования обратных координат (рис. 6.11, *b*). Таким образом, даже незначительная погрешность существенно влияет на положение прямой. Справедливости ради необходимо отметить, что это понимали и сами Лайнуивер и Берк, но, тем не менее, это ограничение в настоящее время зачастую игнорируют. В зависимости Хейнса–Вулфа основной вклад вносят данные при наибольших [S], определяемые с наименьшей погрешностью (рис. 6.11, *d*). Это, однако, приводит к графической неопределенности в части графика, отвечающей условию [S] > K_M. В зависимости Эди–Скетчарда (*Eadie–Scatchard*) все данные имеют одинаковый вес, и неопределенность в этом случае обусловлена «присутствием» зависимой переменной v_0 на обеих осях (рис. 6.11, *c*). Преимущество этого графика заключается в возможности более легкой идентификации «выпадающих» точек (на рис. 6.11, *c* таковой является точка, соответствующая минимальной v_0).

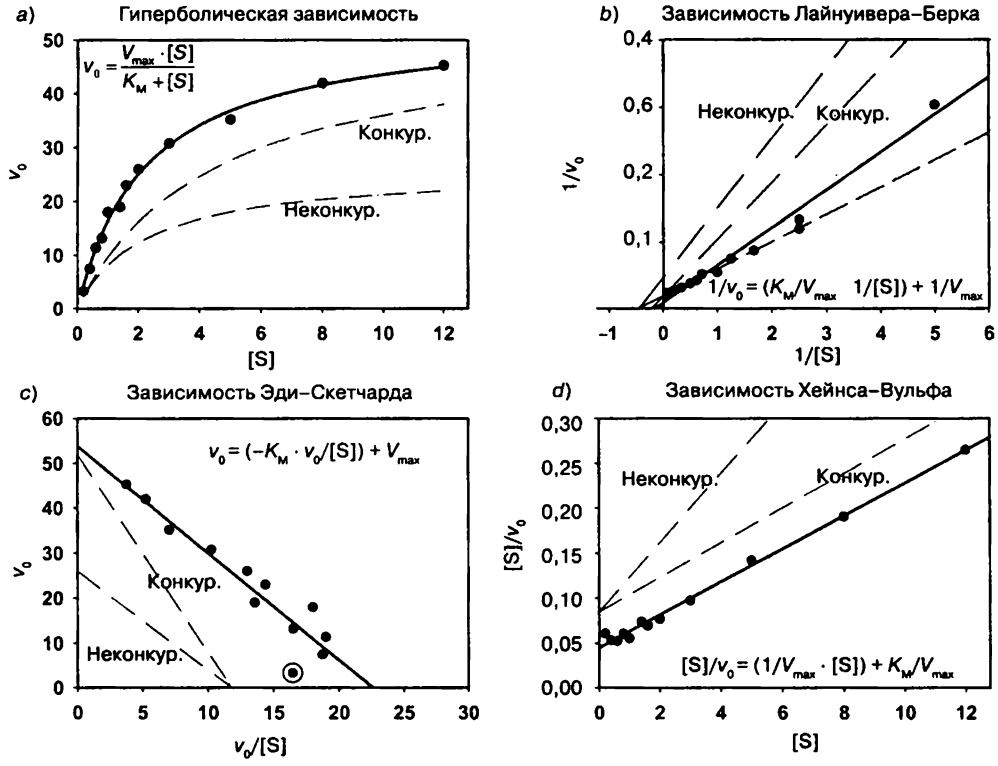


Рис. 6.11. Гиперболическая и линейные зависимости, описывающие кинетику ферментативных реакций. Символы и сплошная линия соответствуют реакции с гипотетическими кинетическими параметрами, указанными в подписи к рис. 6.9. Все линейные зависимости описываются уравнением $y = mx + b$. Штрих-пунктирные линии описыаают разные типы ингибирования (см. рис. 6.12) при соответственно [ингибитор] = 0,8 мМ и K_I = 0,5 мМ (как для конкурентного, так и неконкурентного ингибирования). Пунктиром на графике (*b*) обозначена реакция в отсутствие ингибитора с учетом «выпадающей» точки, наблюдаемой при минимальной концентрации субстрата (эта выпадающая точка показана на графике *c*).

Независимо от используемого метода набор экспериментальных данных должен включать результаты, полученные для концентраций субстрата, которые больше, меньше и приблизительно равны K_M [30, 113]. Это способствует большей определенности в областях гиперболической кривой, отвечающих первому и нулевому порядку (см. рис. 6.9). Точнее, этот набор данных должен соответствовать скоростям при $[S]/K_M$ от 0,3 до 3 (или от 0,5 до 5) — наиболее важному участку, определяющему кривизну линии и зависимость скорости от $[S]$. Линейные преобразования — это не единственный способ оценки кинетических констант ферментативных реакций. Многие компьютерные программы позволяют определять K_M и V_{max} непосредственно по экспериментальным необработанным данным с помощью модели гиперболы в прямоугольных координатах (уравнение (6.17); рис. 6.9 и 6.11, *a*). Эта кривая дает также возможность провести визуальную оценку K_M и V_{max}, а также соответствия экспериментальных данных модельной кривой.

Линейные зависимости нашли применение также при исследовании действия ингибиторов (I) на ферментативные реакции (рис. 6.11, пунктирные линии). Различают конкурентное и неконкурентное ингибирование (рис. 6.12). Конкурентные ингибиторы имеют структуру, сходную со структурой субстрата, и вмешивается в его взаимодействие с активным центром, повышая тем самым величину K_S или K_M и не влияя при этом на $k_{кат}$ и V_{max}. Неконкурентные ингибиторы не влияют на связывание субстрата с активным центром, то есть на K_S или K_M, но эффективно «отравляют» фермент, снижая V_{max} пропорционально связанному с ингибитором количеству фермента ($[EI] + [ESI]$) при данной $[I]$ и соответствующей константе диссоциации ингибитора (K_I) в системе. Эффект, оказываемый конкурентным ингибитором, можно предотвратить путем внесения избытка субстрата и сдвига равновесия к ES и $ES \rightarrow E + P$. Для неконкурентного ингибитора этот прием не работает, поскольку он может связываться или с E, или с ES, так

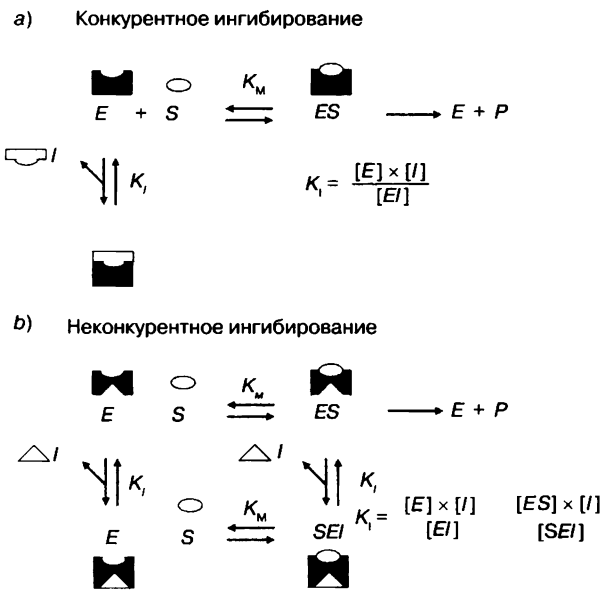


Рис. 6.12. Модель ингибирования ферментативных реакций: *a* — простого конкурентного; *b* — неконкурентного

что $[EI + ESI]$ при данной $[I]$ не зависит от $[S]$. Наклоны кривых, описывающих ингибирование этих двух типов, а также отрезки, отсекаемые на оси ординат (рис. 6.11, *b–d*), свидетельствуют, что в системах без ингибитора и с конкурентным ингибитором V_{max} одинакова, а K_M во втором случае больше. При неконкурентном ингибировании V_{max} уменьшается, а K_M остается постоянной. Уравнения для K_I приведены на рис. 6.12, а K_M и V_{max} отличаются на множитель $(1 + [I]/K_I)$ [30, 113].

К другим менее распространенным типам ингибиторов относятся ингибиторы-«самоубийцы» (субстраты), связывающиеся с активным центром и превращающиеся ферментом в соединение, реагирующее с ферментом и вызывающее его дезактивацию, а также ингибиторы, связывающиеся только с *ES* и отрицательно сказывающиеся на активности фермента. Вместе с тем следует отметить, что данные об ингибиторах последнего типа имеются лишь в небольшом числе работ, и к ним необходимо относиться с некоторой долей скептицизма [29].

6.2.6. Специфичность и селективность ферментов

Понятия «специфичность» и «селективность», зачастую рассматривающиеся как равнозначные, относятся к *дискриминирующей* (различительной) *способности* ферментов. Ферменты могут различать конкурирующие субстраты благодаря различному сродству связывания и каталитической активности. Фермент называют специфичным, если он реагирует только с субстратами, имеющими определенную связь (пептидную, эфирную, гликозидную) или группу (альдогексозную, спиртовую, пентадиеновую). Абсолютной специфичности соответствует ситуация, когда катализируется одна химическая реакция с участием определенного субстрата(ов). Ферменты могут также обладать специфичностью к продукту или стереохимической специфичностью. Таким образом, *специфичность* можно рассматривать как общее и/или *эксклюзивное* свойство реакций, катализируемых ферментами. Понятие *селективность* относится к относительной реакционной избирательности фермента применительно к тому или иному субстрату и определяется как V_{max}/K_M (см. раздел 6.2.5). В первом приближении эти два термина могут считаться взаимозаменяемыми [41].

6.2.6.1. Специфические свойства важнейших пищевых ферментов

6.2.6.1.1. Протеолитические ферменты

В некоторых ранних, считающихся классическими исследованиях в роли некаталитических центров для распознавания субстрата использовался папаин (ЕС 3.4.22.2) — цистеиновая протеаза из млечного сока папайи, применяющаяся для тендеризации (размягчения) мяса. В экспериментах с использованием в качестве субстратов синтетических пептидов были картированы различные сайты этого фермента и субстратов [109, 110], и на основании этого была установлена относительная селективность данного фермента (рис. 6.13) [109, 110]. Подобный способ применяется в настоящее время для исследования всех протеаз-пептидных реакций. Разрывающаяся связь в пептиде обозначается как связь между фрагментами P_1 и P_1'. Другие аминокислотные остатки субстрата последовательно обозначаются P_2, P_3, ..., P_i по направлению к N-терминальной группе и P_1', P_2', ..., P_i' по направлению к С-терминальной группе. Взаимодействующие с субстратом субсайты папаина S и S' обозначаются теми же номерами, что и соответствующие центры субстрата. Если фрагмент P соответствует одной аминокислоте, то символ S_x может относиться к одному или нескольким аминокислотным остаткам, совместно взаимодействующим с соответствующим

фрагментом субстрата. Результаты исследования селективности, использованные для идентификации важнейших фрагментов папаина, представлены на рис. 6.13.

Хотя папаин считается ферментом, гидролизующим целый ряд пептидных связей, он преимущественно взаимодействует с субстратами, имеющими ароматический неполярный фрагмент *PHE* в P_2-участке субстрата (данные по другим субстратам на рисунке не показаны). Следовательно, несмотря на то что *PHE* не является частью гидролизующейся пептидной связи, S_2-сайт распознает именно *PHE*, что в конечном счете и определяет, какая пептидная связь будет гидролизоваться. Это означает, что *S*2 также содержит гидрофобный(е) фрагмент(ы), и селективность папаина в процессах гидролиза определяется в основном взаимодействием между P_2 и S_2. Активный участок папаина представляет собой своего рода глубокую «клешню», на противоположных частях которой находятся каталитические остатки CYS_{25} и HIS_{159} [116]. S_2-пространство папаина составляют до семи неполярных остатков с обеих сторон клешни. Отметим для сравнения, что субстратную селективность сериновых протеаз обеспечивают взаимодействия (суб)сайтов *S*1/*P*1, а важнейшие аминокислотные остатки и результирующая селективность связей трипсина, химотрипсина и эластазы определяются преимущественно стерическими и электростатическими факторами (рис. 6.14) [41, 140].

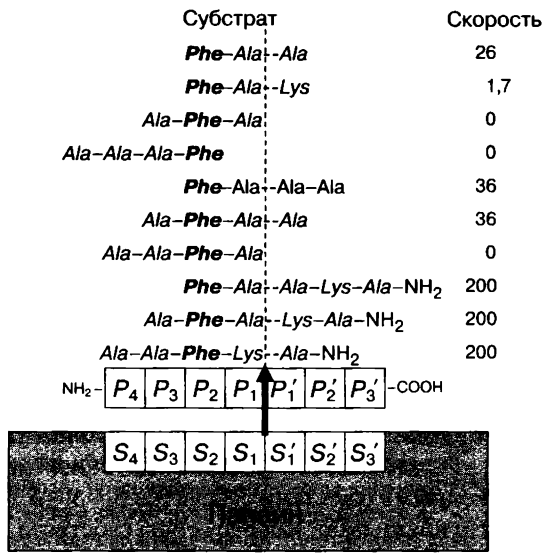


Рис. 6.13. Субстратное «картирование» активного центра папаина по данным кинетического анализа с использованием пептидных субстратов. Скорости реакции нами нормализованы, так как реакционная способность субстратов определялась по данным анализа конечных результатов после разных инкубационных периодов (начальные скорости не измерялись). Стрелкой и пунктирной линией показана разрывающаяся пептидная связь. По [109, 110]

Лучше всего изучены селективные свойства кислой протеазы химозина (ЕС 3.4.23.4, называемой также реннином), используемой исключительно в сыроделии. Ферментный препарат, получаемый из желудков телят (сычуг или «реннет»), проявляет высокую селективность при гидролизе связи PHE_{105}–MET_{106} каппа-казеина на стадии свертывания молока в сыроделии. Кинетические исследования действия химозина на синтетические пептиды, моделирующие фрагменты каппа-казеина в качестве субстрата, позволили выявить факторы, определяющие селективность этого фермента (табл. 6.4) [134]. Показано, что химозин является размерно-селективной эндопептидазой, взаимодействующей с субстратом, представляющим со-

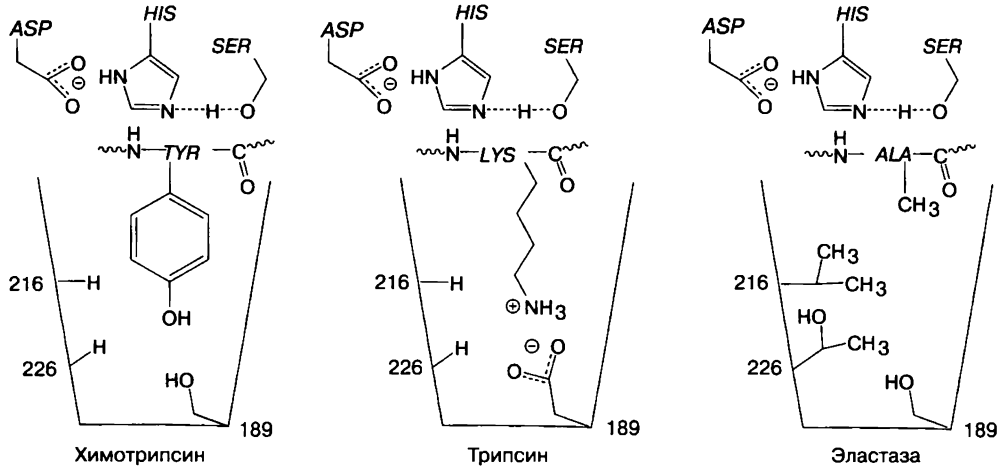


Рис. 6.14. Субстрат-связывающие «карманы» сериновых протеаз. Предпочтительная P_1-боковая аминокислотная цепь показана в связывающем «кармане» вместе с другими боковыми аминокислотными цепями фермента в субсайтах 216, 226 и 189. По [41, 140]

бой как минимум пентапептид, в котором ни *PHE*, ни *MET* не могут быть терминальными фрагментами (в табл. 6.4 это не отражено). Таким образом, взаимодействие с пептидными фрагментами субстратов *a* и *b* можно рассматривать как базальный уровень активности химозина по отношению к связи *PHE–MET* в пептидах минимального размера. Увеличение размера пептида со стороны С-терминального фрагмента (субстраты *c* – *g*) повышает селективность ($k_{кат}/K_M$) по отношению к связи *PHE–MET* на 2–3 порядка по сравнению с субстратом *b*, причем повышение $k_{кат}$ дает больший вклад, чем понижение K_M, хотя влияние оказывают оба параметра. Это свидетельствует о той важной роли в распознавании субстрата и, особенно в стабилизации переходного состояния, которую играют фрагменты $ILE\text{-}PRO\text{-}PRO_{108-110}$, причем наибольшее значение имеет жесткость пролиновых фрагментов (вызывающих, возможно, напряжение или искажение). Пролин может облегчить доступ протеазы к разрывающейся связи в реакции с целым каппа-казеином (см. главу 15). Увеличение размера пептидного субстрата со стороны N-терминального фрагмента (субстраты *h* и *i*) увеличивает селективность еще на два порядка. Это обусловлено почти исключительно повышением сродства (связывания) субстрата к ферменту, о чем свидетельствует уменьшение K_M при почти неизменной $k_{кат}$. Положительно заряженный при используемых значениях pH кластер $HIS_{98,100,102}$ удерживает субстрат в активном центре за счет координации с соответствующими отрицательно заряженными группами субсайтов $S_8–S_6–S_4$ фермента, обеспечивая электростатическое притяжение. Этот пример показывает, как структура субстрата может повысить селективность ($k_{кат}/K_M$) по отношению к разрывающейся связи почти на пять порядков за счет отдаленных участков взаимодействия с ферментом. Этот пример также объясняет, почему в сыроделии безуспешно пытаются использовать «сычуги микробиологического происхождения» (заменители химозина): эти альтернативные протеазы обычно характеризуются меньшим соотношением свертывающей и протеолитической активности (0,10–0,52), чем химозин (1,4), что приводит к ухудшению текстуры сырного сгустка и появлению в процессе созревания сыра горького привкуса [70].

Таблица 6.4

Взаимодействия фермент-субстрат, определяющие селективность химозина по отношению к связи *PHE–MET* каппа-казеина. По [134]

Каппа-казеин	Пептид			$k_{кат}$, $с^{-1}$	K_M, мМ	$k_{кат}/K_M$, $с^{-1}/мМ^{-1}$
	100	105↓106	110			
Контроль	*His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys*					
a		*Ser-Phe-Met-Ala-Ile-OMe*		0,33	8,5	0,04
b		*Leu-Ser-Phe-Met-Ala-OMe*		0,58	6,9	0,08
c		*Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-OMe*		18,3	0,85	21,6
d		*Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-OMe*		38,1	0,69	55,2
e		*Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-OMe*		43,3	0,41	105
f		*Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-OH*		33,6	0,43	78,3
g		*Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH*		29,0	0,43	66,9
h	*His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-OH*			66,2	0,026	2510
i	*His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-OH*			61,9	0,028	2210

6.2.6.1.2. Гликозилгидролазы (гликозидазы)

Гликозилгидролазы действуют на гликозидные связи в ди-, олиго- и полисахаридах [116, 141, 147]. Природа и степень фермент-субстратного распознавания, а также расположение активных центров в этих ферментах хорошо изучены. К этой группе ферментов относятся:

глюкоамилаза — экзо-гидролаза, высвобождающая отдельные остатки глюкозы с нередуцируемого конца линейных мальтоолигосахаридов по связи α,1→4;

лизоцим — эндо-гидролаза, распознающая повторяющуюся α,1→4-связь в гетеродимере (*N*-ацетилглюкозамин [*NAG*] →*N*-ацетилмурамовая кислота [*NAM*]$_n$);

α-амилаза — эндо-гидролаза, случайным образом разрывающая α,1→4-связь (глюкоза)$_n$ на линейных участках крахмала (рис. 6.15) [25, 74, 80]).

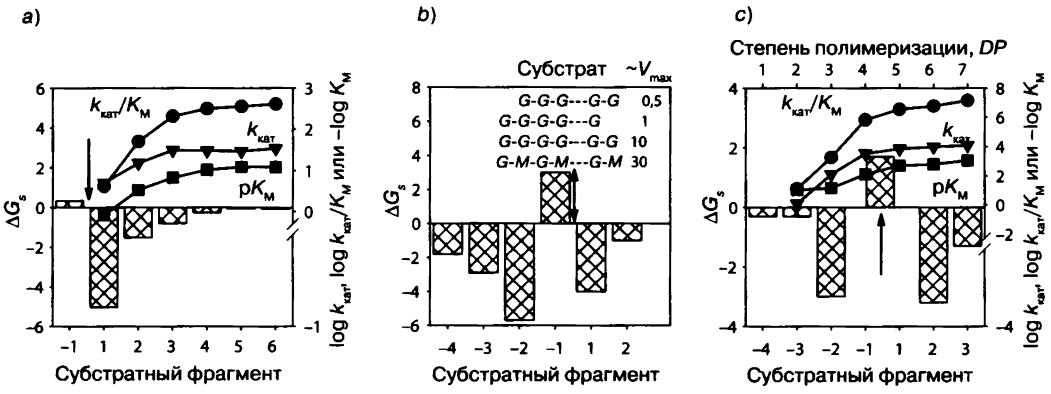


Рис 6.15. «Картирование» активных центров гликозилгидролаз по данным кинетического анализа. Активность определялась для последовательности α-1,4-связанных олигомеров глюкозы, состоящих из 1–7 единиц для (*a*) глюкоамилазы и (*c*) α-амилазы. Наименьшим субстратом для обоих ферментов была мальтоза, но связывание глюкозы характерно и для глюкоамилазы. Для последней кинетические константы соответствуют длине субстрата, увеличивающейся от −1 до *n*, а для α-амилазы — величине *DP* (степени полимеризации) олигомеров; в случае лизоцима (*b*) кинетические константы определены для модельных субстратов (*G* — N-ацетилглюкозамин, *M* — N-ацетилмурамовая кислота). Для каждого субсайта определена ΔG_s (стрелками показана разрывающаяся связь). По [25, 74, 80]

Как и в случае протеаз, субстратсвязывающие сайты в гликозилгидролазах обозначаются (*−n*, ..., −2, −1, +1, +2, ... *+ n)* [34]. Гидролиз протекает по гликозидной связи остатка с карбонильной группой в субсайте −1 и спиртовой группы в субсайте +1. Фермент-субстратное взаимодействие по одному или обоим указанным субсайтам может вносить вклад в невыгодное изменение свободной энергии, соответствующей процессу ассоциации ($+\Delta G_s$), что вполне ожидаемо, поскольку энергия подвергающейся перестройке связи в субстрате должна возрасти до энергии переходного состояния. Взаимодействие по субсайтам, окружающим перестраивающийся участок (участки), вносит вклад в выгодное (отрицательное) ΔG_s связывание (в этом случае энергия связывания способствует катализу). Фермент-субстратное взаимодействие «картируется» или ограничивается длиной субстрата по направлению к субсайтам *+n* или *—n*, когда дальнейшее увеличение длины не влияет на каталитические параметры. В случае глюкоамилазы (рис. 6.15, *a*) лучше всего улучшают связывание и катализ сайты от +1 до +3, тогда как другие центры при улучшении связывания на катализ влияют незначительно.

Из рис. 6.15, *b* следует, что в случае лизосом основной вклад в повышение реакционной способности вносит взаимодействие остатков в субсайтах −2 и +1, однако на катализ существенно влияют даже удаленные субсайты −4 и +2 [41, 138, 147]. Главную роль в фермент-субстратном распознавании играют водородные связи, особенно между субстратными остатками −4/−3 и ASP_{101}. Важна также структура субстрата. Для более объемного остатка *NAM* лучше подходит субсайт −1, поскольку связыванию с ферментными субсайтами −4, −2 и +1 препятствуют стерические барьеры, обусловленные присутствием в *NAM* лактильных фрагментов. В случае α-амилазы (рис 6.15, *c*) фрагменты −2/+2, ближайшие к расщепляющейся мальтозной единице (−1/+1), обеспечивают наиболее отрицательную ΔG_s для связывания и катализа. Дальнейшее увеличение степени полимеризации (*DP*) больше влияет на связывание ($K_м$), чем на катализ ($k_{кат}$). Во всех трех примерах энергия удаленных фермент-субстратных взаимодействий стабилизирует переходное состояние в активном центре.

6.2.6.1.3. Ферменты, катализирующие превращения липидов

У липаз имеются сайты связывания как ацильного, так и спиртового фрагментов гидролизующегося эфира, причем у каждого сайта имеется два субсайта (рис. 6.16, *a*) [59]. Эти сайты содержат много гидрофобных остатков, а селективность в основном определяется объемом связывающих «карманов». Например, размеры большого (L_A) и среднего (M_A) ацильных субсайтов липазы *Candida rugosa* близки к размерам соответственно С8- и С4-*n*-ацильных групп (рис. 6.16, *b*) [86], что проявляется в повышенной реакционной способности по отношению к этим группам (но не близко расположенной С6-*n*-ацильной группе!).

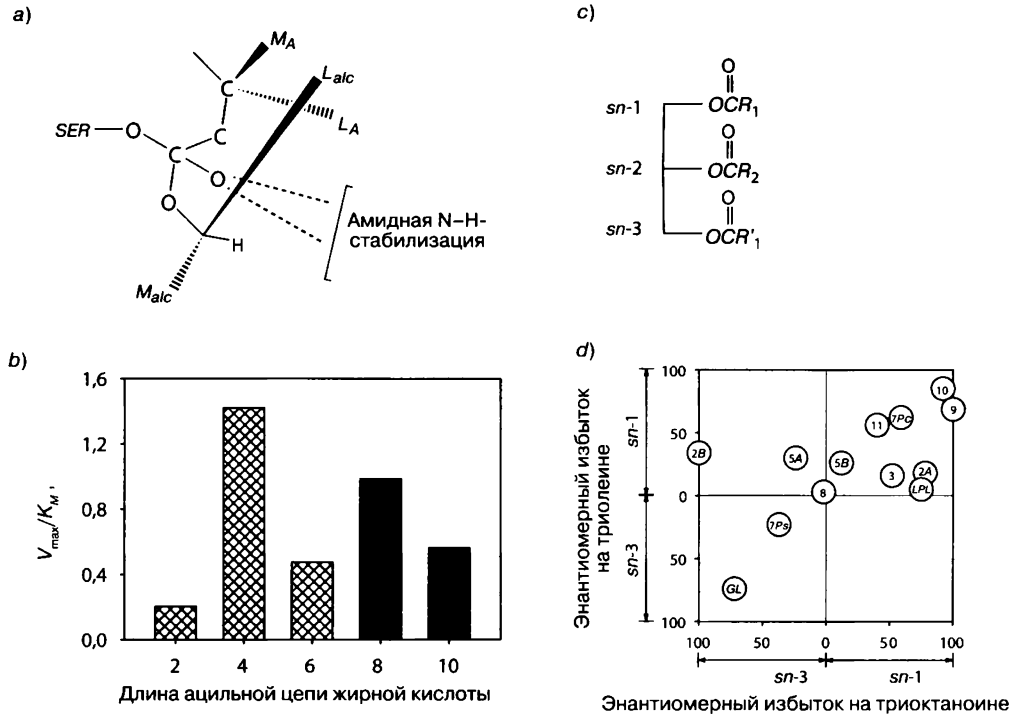


Рис. 6.16. Особенности субстратной селективности липаз: *a*) — ориентация субстратного связывания; *c*) — стереоспецифическая нумерация глицеринового скелета. По-разному закрашенные столбцы на рис. *b* отражают различное распределение стереоизомеров *rac*-α-гидроксилированных жирных кислот. Цифровые обозначения липаз (рис. *d*) приведены в табл. 6.8 (буква соответствует изоформе фермента): *LPL* — молочная липопротеинлипаза; *GL* — липаза желудка человека; *7Ps* — липаза *Penicillium simplicissimum*; *7Pc* — липаза *P. camembertii*. По [59, 86, 103]

Многие липазы имеют разные оптимумы для ацильных фрагментов жирных кислот разной длины [2, 69, 99]. Спиртовая группа субстрата-эфира присоединяется к сайту, подвергаемому действию растворителя и предоставляющему субсайты, способные принять большую (L_{alc}) и среднюю (M_{alc}) составные части спиртового фрагмента (и отщепляемую группу, рис. 6.16, *a*). С группой M_{alc} взаимодействуют не менее трех аминокислотных остатков липаз (соседних с *SER/HIS* остатками, входящими в каталитический центр, и оксианион-стабилизирующими амидными группами), увеличивая селективность по отношению к спиртовой группе [59]. Другие особенности субстратсвязывающих участков липаз — это доступность, объем, топография, которые обеспечивают региоселективность по отношению к эфирным группам (рис. 6.16, *c*, в зависимости от *sn*-1,3-региоспецифичности или неспецифичности) [103], а также селективность по отношению к жирным кислотам (насыщенным или ненасыщенным) [2, 69, 99]. Эти три фактора, влияющие на селективность по отношению к ацильным и спиртовым группам, определяют стереоспецифичность (почти все смешанные триацилглицерины являются хиральными). Исследование с использованием двух модельных субстратов (триолеина и триоктаноина) дает представление о стереоспецифичности липаз и ее зависимости от структуры субстрата (рис. 6.16, *d*).

Селективные свойства липоксигеназам, реагирующим исключительно с 1,4-пентадиеновой группой полиненасыщенных жирных кислот (их примером может служить линолевая кислота, $C18{:}2_{9c,12c}$), придает целая группа факторов. В зависимости от позиционной селективности (региоселективности) по отношению к окисляющейся арахидоновой кислоте ($C20{:}4_{5c,8c,11c,14c}$) липоксигеназы классифицируются как 5-*LOX*, 8-*LOX*, 9-*LOX*, 11-*LOX*, 12-*LOX*, 15-*LOX*. У липоксигеназы имеются две большие полости, обеспечивающие доступ к активному центру. Одна длинная воронкообразная полость содержит гидрофобные остатки и обеспечивает доступ кислорода к активному центру [96], а другая полость, также богатая нейтральными и гидрофобными остатками, сравнительно узкая, образует около активного центра «карман» в форме сапога и принимает субстрат — жирную кислоту (рис. 6.17) [13, 27, 62, 96]). Липоксигеназы про-

являют селективные свойства при оксигенации атома углерода пентадиена в позициях [−2] или [+2] относительно метиленового углерода (места отщепления H) терминальной карбоновой кислоты [62]. Это отражает основное различие специфичности липоксигеназ по *продукту*, обусловленное тем, *как фермент «отсчитывает атомы углерода»*, — все зависит от того, осуществляется ли связывание преимущественно через карбоксилат (связывание ([−2]-типа), или первым в связывающий карман входит метильный фрагмент (связывание [+2]—типа).

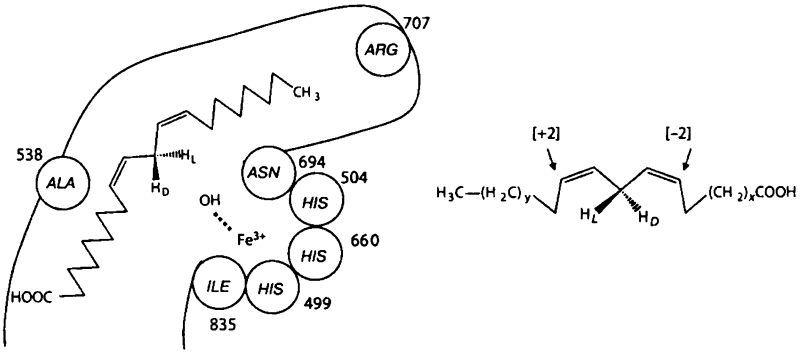


Рис. 6.17. Активный центр и позиционная (стерео)селективность липоксигеназы. По [13, 27, 62, 96]

Сайт оксигенации зависит также от того, какая из нескольких 1,4-пентадиеновых систем (C18:$3_{9c,12c,15c}$ имеет две, а C20:$4_{5c,8c,11c,14c}$ три таких системы) взаимодействует с железом активного центра. Это частично зависит от размера связывающего жирные кислоты «кармана». Большие связывающие карманы принимают более длинные части жирных кислот и сдвигают позиционную селективность по направлению к карбоксильному концу (например, 5-LOX) жирных кислот, входящих в «карман» метильной группой. Размер связывающего жирные кислоты кармана определяется также размером входящих в «карман» аминокислотных R-групп (в области ARG_{707}, рис. 6.17), аналогично сериновым протеазам (см. рис. 6.14). Наконец, образование *S*- или *R*-гидропероксидов жирных кислот, определяющееся стереоспецифичностью липоксигеназ, зависит от одного аминокислотного остатка в ферменте (в соевой *LOX*-изоформе 1 — остатка 538), являющегося, соответственно, аланином (R-группа = CH_3) или глицином (R-группа = H) [27]. ALA_{538} стерически препятствует присоединению кислорода на ближайшем участке (pro-R, C-9) и определяет 13*S*-стереоселективность, тогда как GLY_{538} не мешает оксигенации на соседнем участке с образованием *9R*-гидропероксидов (рис. 6.17). Эта особенность характерна для всех известных к настоящему времени липоксигеназ.

Селективность липоксигеназной реакции зависит также от того, этерифицирована ли жирная кислота, в какой форме она находится (мицеллярной, в виде комплекса с детергентом или в виде соли), и значения pH, определяющего степень диссоциации карбоксильной группы. Влияние pH зачастую объясняют ориентацией субстрата [141]. Наибольшую селективность *LOX*-1 сои проявляет при pH около 9. В этих условиях количество полученных 13-гидроперокси-октадиеноата и 9-гидроперокси-октадиеноата соотносятся примерно как 10 : 1, а при pH около 7 эти продукты реакции образуются приблизительно в равных количествах. При pH 9 ионизированный карбоксилат придает линолеату такую ориентацию, как показано на рис. 6.17, однако при pH 7 протонированная линолевая кислота может иметь «обратную» ориентацию карбоксильной группы, что способствует присоединению кислорода к C-9-группе. Этот пример показывает, как структура субстрата может влиять на селективность фермента.

6.2.6.2. Номенклатура и классификация ферментов

Поскольку «тривиальные» названия ферментов зачастую не дают полного представления о катализируемых ими реакциях, всем ферментам присвоены систематические названия согласно правилам номенклатуры, разработанным Комиссией по ферментам (*Enzyme Commission, EC*) Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (*The International Union of Biochemists and Molecular Biologists, IUBMB*). Хотя тривиальные названия используются еще довольно часто, применение кода *EC* позволяет избежать двусмысленности при описании той или иной реакции. Этот *EC*-код состоит из четырех числовых зон, каждая из которых относится к определенному свойству ферментативной реакции (табл. 6.5). Первая числовая зона — это тип реакции. Наиболее важными для пищевой химии являются гидролазы (класс 3), затем следуют оксидоредуктазы (класс 1). Тривиальные названия трансфераз (класс 2) иногда включают термин «синтаза», близкий к термину «синтетаза», который используется в названиях лигаз (класс 6) —

Таблица 6.5
Номенклатура и классификация ферментов. По данным *IUBMB*, см. *http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/*

Первая числовая группа — класс ферментов (тип реакции)	Вторая числовая группа — подкласс (субстрат, донор, связь), примеры	Третья числовая группа — подподкласс (другая различительная группа, субстрат, акцептор, признаки), примеры	Четвертая числовая группа — регистрационный номер, позволяющий различать ферменты с одинаковыми первыми тремя числовыми группами (примеры и тривиальные названия)	Принцип систематического наименования
1. Оксидоредуктаза (окисление–восстановление)	Группа в окисляющемся доноре:	Восстановленный (редуцированный) акцептор		Донор:акцептор оксидоредуктазы
	1. CH–OH	1. НАД(Ф)	1.1.1.1. Алкогольдегидрогеназа	
	10. Дифенольная (или ее аналоги)	3. O_2	1.10.3.1. Катехол(дифенол)оксидаза	
	13. Единственный донор, O_2	11. С участием двух атомов О	1.13.11.12. Липоксигеназа	
	14. Парные доноры, O_2	18. С участием одного атома О	1.14.18.1. Монофенолмонооксигеназа	
2. Трансфераза (перенос группы)	Переносимая группа	Дальнейшее описание группы		Донор:акцептор группы трансфераз
	3. Ацильная	1. Отличная от аминогруппы	2.3.1.175. Алкогольацилтрансфераза	
	4. Гликозильная	2. Аминогруппа	2.3.2.13. Трансглютаминаза	
		1. Гексозильная группа	2.4.1.19. Циклодекстрингликозилтрансфераза	
3. Гидролаза (гидролиз)	Гидролизуемая связь	Класс субстрата		Гидролаза
	1. Эфирная	1. Карбоксильный эфир	3.1.1.3. Липаза	
	2. Гликозидазная	1. О- или S-гликозил	3.2.1.147. Мирозиназа (тиоглюкозидаза)	
	4. Пептидная	24. Металлопептидаза	3.4.24.27. Термолизин	
4. Лиаза (элиминирование)	Разрываемая связь	Удаляемая (элиминируемая) группа		Субстратная группа лиаз
	1. C–C	2. Альдегидлиаза	4.1.2.32. *TMNO*-альдолаза	
	2. C–O	2. Действующая на полисахариды	4.2.2.10. Пектинлиаза	
	4. C–S	1. (Отсутствует, таких фементов только 23)	4.4.1.4. Аллиинлиаза	
5. Изомераза (изомеризация)	Тип реакции	Субстрат, положение, хиральность		Рацемаза, эпимераза, изомераза, мутаза
	2. *цис–транс*-изомеризация	1. (Отсутствует, таких фементов только 10)	5.2.1.5. Линолеатизомераза	
	3. Межмолекулярное окисление–восстановление	1. Взаимопревращение альдозы и кетозы	5.3.1.5. Ксилозоизомераза	
6. Лигаза (образование связи)	Образующаяся связь	Субстрат, косубстрат(ы)		*X–Y*-лигаза (синтетаза)
	4. C–C	2. Кислота–аминокислота (пептид)	6.3.2.3. Глутатионсинтетаза	

ферментов, действительно являющихся «синтезирующими» или связь-образующими. Лиазы (класс 4) — это ферменты, разрушающие связи вследствие негидролитических процессов; тривиальные названия ферментов, вызывающих реакции, обратные реакциям лиаз, могут включать термины «синтаза» и «гидратаза». Изомеразы (класс 5) вызывают внутримолекулярные перегруппировки атомов. Вторая и третья числовые зоны более детально определяют реакцию, субстрат(ы) и/или перестраивающуюся связь. У ферментативных реакций, которые затруднительно отнести к той или иной группе, третья зона заполняется цифрами 99. Последняя числовая зона выполняет функцию «счета» и служит для разграничения ферментов с одинаковыми двумя первыми числовыми зонами, а также дает дополнительную информацию о реакции. Выше мы уже указывали некоторые ЕС-коды при первом упоминании того или иного фермента.

6.3. Применение экзогенных ферментов в производстве пищевых продуктов

6.3.1. Общие положения

Решение о применении ферментативных технологий зависит от нескольких факторов [16, 88]. К использованию ферментов прибегают, если:

для сохранения положительных свойств продукта допустимо применение мягких режимов обработки;

неприемлемо образование возможных побочных продуктов химических реакций;

химические реакции трудно контролировать;

требуется сохранить такую характеристку продукта, как «натуральный»;

продукт или ингредиент относится к премиум-классу;

необходимо заменить или расширить традиционную химическую технологию;

требуется реакционная специфичность.

Весьма важны и ценовые преимущества. Некоторые ферменты можно использовать в «иммобилизованном» виде, то есть фиксированными на инертных матриксах или частицах с сохранением активности ферментов. Такая иммобилизация позволяет помещать ферменты в колонну или биореактор, через которую прокачивается субстрат, или регенерировать катализатор путем фильтрования или отстаивания. Тем самым фермент можно использовать многократно до тех пор, пока его активность не понизится до неприемлемого уровня, что позволяет снизить затраты на фермент.

Экзогенные ферменты используют в производстве таких ингредиентов и пищевых продуктов, как кукурузные сиропы, ВФКС (высокофруктозный кукурузный сироп), инвертный сахар и другие подсластители, белковые гидролизаты, структурированные липиды. Применяются ферменты и при модификации компонентов пищевого матрикса, например, для стабилизации пива, свертывания молока (в сыроделии), тендеризации мяса, устранения горького привкуса соков цитрусовых и разрыхления хлебного мякиша, а также в целях модификации технологических процессов, в частности, созревания сыра, экстрагирования соков, осветления соков и вин, экстракции масел из семян плодовых и масличных культур, фильтрования напитков (пива и вин), ускорения брожения теста, разрыхления и стабилизации хлебобулочных изделий. Ферменты облегчают технологический контроль, в частности, с помощью поточных биосенсоров, а также анализ компонентов. Основные направления использования экзогенных ферментов представлены далее в зависимости от компонента, подлежащего обработке [3, 48, 127, 142].

6.3.2. Ферменты, катализирующие превращения углеводов

Большинство промышленно применяемых для воздействия на углеводы ферментов являются гидролитическими и относятся к гликозилгидролазам (гликозидазам). Некоторые из этих ферментов могут катализировать в пищевых технологиях перенос гликозильной группы и/или обратные гидролитические реакции, когда концентрации субстратов зачастую бывают довольно высокими (содержание СВ 30–40%) из-за действия массопереноса. Ферменты этой группы в стоимостном выражении составляют примерно 50% всех ферментов, используемых в пищевых технологиях. Основными областями их применения являются

производство подсластителей, наполнителей и загустителей (декстринов) из крахмала, а также модификация углеводов в хлебопечении. Развиваются и другие области применения гликозидаз [116, 141, 147].

Некоторые общие свойства ферментов, представляющих более 60 семейств гликозидаз, детально изучены методами структурного анализа и секвенирования. Эти действующие на гликозидные связи ферменты обладают целым рядом общих структурных и каталитических свойств. Многие гликозидазы представляют собой мультидоменные белки, отдельные части которых выполняют разные функции, в частности каталитическую и связывающую. Активные центры гликозидаз содержат двойные карбоксильные/карбоксилатные остатки (*ASP/GLU*) подобно лизоциму (см. уравнение 6.8). Эта группа ферментов действует по механизмам общего кислотно-основного и/или нуклеофильного катализа, где основную роль играют электростатические эффекты и эффекты напряжения/искажения. Во всех случаях кислотный остаток отдает H^+ гликозидному атому O, при этом в качестве переходного состояния образуется оксокарбониевый ион (рис. 6.18) [116]. Карбоксилатный остаток или депротонизирует и активирует воду с образованием нуклеофильной группы OH^- для завершения гидролиза, или действует непосредственно как нуклеофил, образуя ковалентный интермедиат; и в том, и в другом случае отщепляется спиртовая группа.

Все гликозидазы можно разделить на два типа — «удерживающие» и «инвертирующие» — в зависимости от того, что происходит с аномерной конфигурацией (α или β) гидролизующейся гликозидной связи (рис. 6.18). В гликозидазах инвертирующего типа расстояния между кислотными каталитическими остатками превышают примерно 9,5 Å, что дает возможность активированной молекуле воды (нуклеофилу) получить доступ к альтернативному аномерному участку, а не к участку ROH, высвобождаемому из гликозидной связи. В «удерживающих» гликозидазах расстояние между каталитическими центрами составляет менее 5,5 Å, и вода достигает активного центра только *после* того, как спиртовая группа его покинет, то есть протекает реакция двойного замещения. При реализации механизма «удерживания» гликозил-ферментный ковалентный интермедиат с карбоксилатным остатком служит для направления

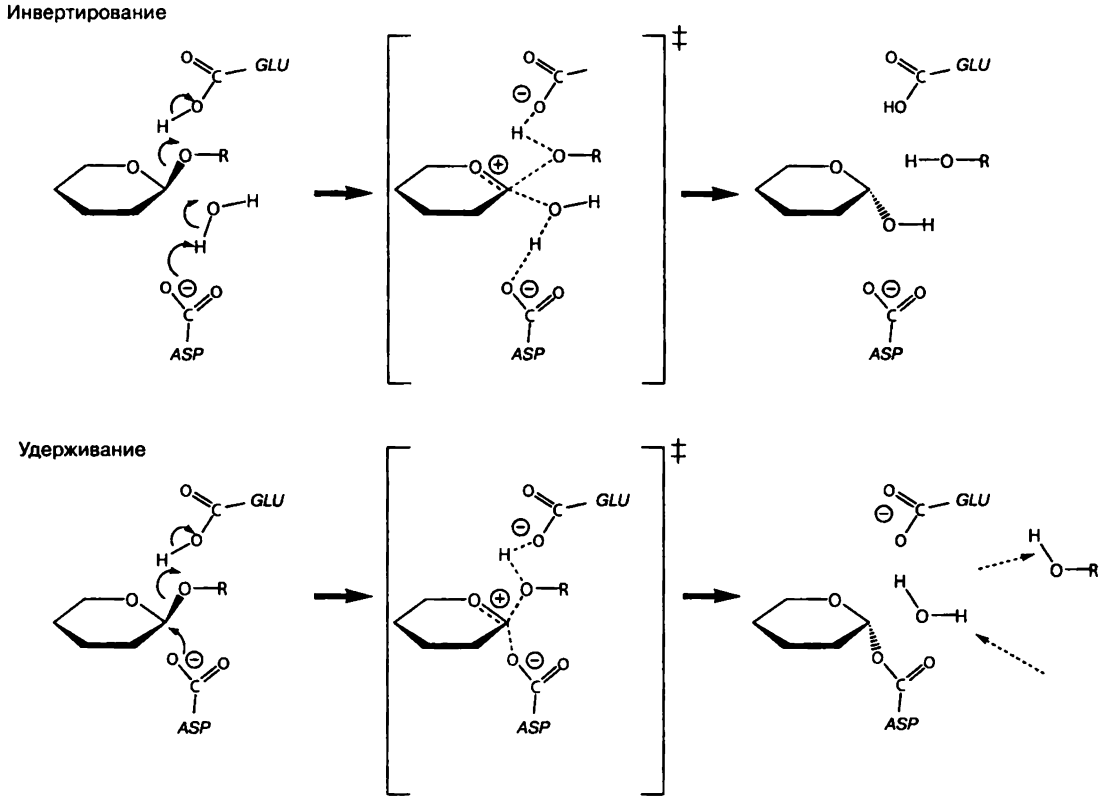


Рис. 6.18. Разнообразие механизмов реакций гликозилгидролаз. По [116]

нуклеофильной воды в то же аномерное положение, которое занимала отщепляемая спиртовая группа, и поэтому аномерная конфигурация остается без изменений. Только «удерживающие» гликозидазы катализируют и гидролиз, и перенос гликозила, тогда как «инвертирующие» гликозидазы катализируют лишь реакцию гидролиза.

Гликозидазы подразделяют также на «экзо-» и «эндо»-активные. Первые связывают терминальный (преимущественно, но не всегда нередуцируемый) конец фрагмент субстрата как расщепляющуюся связь в активном центре, тогда как вторые случайным образом атакуют внутренние участки субстрата. Тривиальные обозначения гликозидаз греческими буквами α и β (подобно амилазам и глюкозидазам) указывают соответственно на аксиальную и экваториальную аномерную конфигурацию высвобождающейся редуцированной группы. Данные о наиболее важных для пищевой промышленности гликозидазах приведены в табл. 6.6. О картировании активных центров и субстрата мы упоминали ранее (см. рис. 6.15, где расщепляющаяся гликозидная связь находится при субсайтах −1/+1). В большинстве случаев один или два гидрофобных фрагмента фермента взаимодействуют с С5-гидроксил-метиленовой группой −1-й позиции субстратного остатка, обеспечивая своего рода «гидрофобную платформу», стабилизирующую переходное состояние [79].

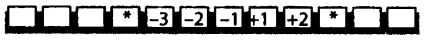
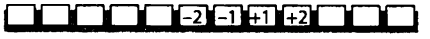
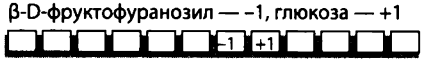
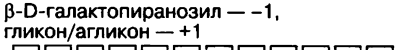
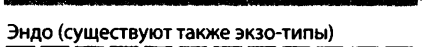
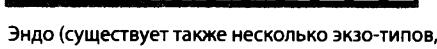
6.3.2.1. Ферменты, катализирующие превращения крахмала

Действующие на крахмал ферменты используют в основном при производстве кукурузных сиропов (крахмальной патоки), декстринов, глюкозных сиропов с высоким содержанием фруктозы и других подслащивающих веществ, в частности мальтозного и глюкозного сиропов. Менее глубокие превращения крахмала используются в хлебопечении. Для замедления черствения хлебобулочных изделий и улучшения разрыхления применяют экзогенные гликозидазы.

6.3.2.1.1. α-Амилаза

Амилазы используют в процессах гидролиза крахмала (преимущественно из кукурузы) до более мелких декстринов и, следовательно, для получения «тонких» суспензий крахмала [116, 131, 141, 147]. α-Амилаза (ЕС 3.2.1.1, 1,4-α-*D*-глюкан-глюканогидролаза) представляет собой эндоактивный, α → α-удерживающий фермент, быстро снижающий среднюю молекулярную массу полимеров крахмала. Это типичный представитель семейства из 13 гликозидаз, некоторые из которых используются при производстве крахмалопродуктов. Ферменты этой группы имеют не менее трех отдельных доменов внутри белка — один для катализа, второй для связывания зерен крахмала, а третий необходим для связывания кальция и образования мостика между двумя другими доменами. Молекулярная масса ферментов из различных источников (по данным более 70 секвенирований) составляет обычно 50–70 кДа, достигая иногда 200 кДа. α-Амилазы связывают Ca^{2+} с помощью нескольких сайтов, наиболее важным из которых является центр, располагающийся около активного «клешнеподобного» сайта, что стабилизирует вторичную и третичную структуры. Ca^{2+} связывается ферментами достаточно прочно, что позволяет повысить стабильность амилаз в диапазоне pH от 6 до 10. Термостойкость α-амилаз существенно зависит от их источника. Активный центр фермента состоит не менее чем из пяти субсайтов (позиции от −3 до +2; см. табл. 6.6 и рис. 6.15, *c*), а длина субстрата должна быть не менее трех глюкозных единиц. Из трех сохраняющихся фрагментов в активном сайте (рассмотрим в качестве примера α-амилазу поджелудочной железы свиньи) один (ASP_{197}) представляет собой нуклеофил, образующий ковалентный гликозил-ферментный интермедиат, второй (GLU_{233}) располагается при +1-м субсайте и действует как общий кислотный катализатор, а третий (ASP_{300}) координируется с С2–ОН и С3–ОН субстратной единицы при −1-м субсайте, что приводит к напряжению субстрата. Оставшиеся HIS_{299} и HIS_{101} участвуют в связывании субстрата и стабилизации переходного состояния, понижая E_a на 5,5 ккал/моль. HIS_{201} взаимодействует с каталитическим остатком GLU_{233}, повышая оптимальное значение pH с 5,2 до 6,9. Поскольку гистидиновые фрагменты существенно влияют на активность и pH-зависимость активности, долгое время считалось, что гистидин играт важную роль в механизме действия α-амилаз. pH-оптимум зависит также от длины молекулы субстрата. Действие на мальтоолигосахариды, не полностью занимающие пять связывающих субсайтов, характеризуется более узким интервалом pH-оптимума. Другими оставшимися неполярными фрагментами являются *TRP*,

Таблица 6.6
Каталитические свойства гликозилгидролаз

Фермент	Селективность по связи	Селективность по продукту	Каталитические фрагменты[a]	Картирование субсайтов субстрата [b]
α-Амилаза	α-1→4 Глюкоза	Удерж. α→α	GLU_{233}, ASP_{300} (кислота, нукл./основание)	Эндо 
β-Амилаза	α-1→4 Глюкоза	Инв. α→β	GLU_{186}, GLU_{380} (кислота, основание)	Экзо 
Пуллуланаза	α-1→6 Глюкоза	Вероятно, удерж. α→α	Неизвестны, возможно, GLU_{706}, ASP_{677} (кислота, нукл./основание)	Эндо, возможны несколько субсайтов 
Глюкоамилаза	α-1→4 (α-1→6) Глюкоза	Инв. α→β	GLU_{179}, GLU_{400} (кислота, основание)	Экзо 
Цикломальтодекстрин трансфераза	α-1→4 Глюкоза	Удерж. α→α	GLU_{257}, ASP_{229} (кислота, нукл./основание)	Эндо 
Инвертаза	β-1→2 Фруктоза	Удерж. β→β	GLU_{204}, ASP_{23} (кислота, нукл./основание)	β-D-фруктофуранозил — −1, глюкоза — +1 
β-Галактозидаза	β-1→4 Галактоза	Удерж. β→β	[c]GLU/Mg^{2+}, GLU_{537} (кислота, нукл./основание)	β-D-галактопиранозил — −1, гликон/агликон — +1 
β-Глюкозидаза	β-1→4, β-1→Агликон глюкозы	Удерж. β →β	GLU_{170}, GLU_{358} (кислота, нукл./основание)	Экзо, β-D-глюкопиранозил — −1 
Полигалактуроназа	α-1→4 Галактуронат	Инв. α→ β	$ASP_{180,201,202}$ вероятно кислотно/основные фрагменты	Эндо (существуют также экзо-типы) 
Ксиланаза	α-1→4 Ксилоза	Удерж. β→β	GLU_{172}, GLU_{78} (кислота, нукл./основание)	Эндо (существует также несколько экзо-типов, некоторые инвертирующие) 
Лизоцим	α-1→4-*NAM-NAG*[d]	Удерж. α →α	GLU_{35}, ASP_{52} (кислота, нукл./основание)	Эндо (*NAM-NAG*-единица связывается на сайах −1/+1) 

[a] Пример фермента см. в тексте.
[b] Знак вопроса (?) показывает, что субсайт не определен, а знак (*) — что этот субсайт имеется у некоторых ферментов.
[c] Вероятная каталитическая группа.
[d] Повторяющаяся единица N-ацетилмурамат-N-ацетилглюкозамин.

TYR и *LEU*, которые участвуют в связывании субстрата и зерен крахмала за счет гидрофобных стэкинг-взаимодействий [33, 141].

Известно несколько источников α-амилаз, большинство из которых являются микробными, хотя поставляются и солодовые амилазы (из ячменного или пшеничного солода). Типичными конечными продуктами действия α-амилаз являются разветвленные предельные α-декстрины и мальтоолигосахариды с 2–12 глюкозными единицами (в основном ближе к 12) [141, 142]. В присутствии амилаз вязкость крахмала быстро снижается благодаря случайному характеру гидролиза; уменьшается и средняя молекулярная масса амилозных и амилопектиновых цепей. Оптимальными условиями для микробных амилаз являются pH 4–7 и температура от 30 до 130 °C [85]. Особый интерес представляют несколько амилаз с оптимумом pH 9–12, причем не столько для пищевых технологий, сколько как пример возможной альтернативы известной гликозидазной диаде *ASP/GLU*. К типичным промышленным источникам α-амилаз относятся микроорганизмы *Bacillus* и *Aspergillus*. α-Амилазы, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, термостойки, и их можно использовать при температурах 80–110 °C (pH 5–7) и при содержании Ca^{2+} 5–60 мг/кг [142]. Оптимальными условиями для α-амилаз, продуцируемых грибами рода *Aspergillus*, являются температура 50–70 °C, pH 4–5 и содержание Ca^{2+} около 50 мг/кг [85,142]. Хотя грибковые α-амилазы относятся к эндо-группе, при их действии накапливаются в основном более короткие мальтоолигосахариды ($n = 2–5$) [127]. Обнаружена также уникальная «мальтогенная» α-амилаза, продуцируемая *Bacillus* (ЕС 3.2.1.133) [26]. Хотя получение мальтозы обычно асоциируют с действием β-амилаз (см. следующий раздел), применение мальтогенных α-амилаз, по-видимому, дает возможность получить больше мальтозы за счет продолжительного (полного) или многократного гидролиза крахмала [33].

6.3.2.1.2. β-Амилаза

β-Амилаза (1,4-α-*D*-глюканмальтогидролаза, ЕС 3.2.1.2) представляет собой α→β-инвертирующую, экзоактивную гликозидазу, высвобождающую мальтозные единицы с нередуцированных концов амилозных цепей и входящую в 14-е семейство гликозидаз [85, 116, 127, 141]. Продолжительное действие β-амилазы на крахмал приводит к образованию смеси мальтозы и β-декстринов; последние сохраняют α-1,6-точки разветвления и линейные участки, недоступные для фермента из-за стерических барьеров. β-декстрины характеризуются большей средней молекулярной массой, чем α-декстрины, так как экзоактивная β-амилаза не активна за α-1,6-точками разветвления, а эндоактивная α-амилаза проявляет активность. β-Амилазы из сои, батата и продуцируемые бактериями рода *Bacillus* относятся к числу наиболее изученных. Молекулярная масса ферментов растений составляет примерно 56 кДа (фермент из батата представляет собой тетрамер), тогда как молекулярная масса микробных ферментов — 30–160 кДа. Уникальность β-амилазы заключается в том, что она,в отличие от других мультидоменных амилолитических гликозидаз, имеет однодоменную структуру.

Рассмотрим в качестве примера β-амилазу сои. Каталитическими остатками являются GLU_{186} (общая кислота) и GLU_{380} (общее основание), находящиеся в глубоком «кармане» на расстоянии 10–11 Å друг от друга. Связываемый субстрат закрывает этот «карман» словно крышкой, что дает выигрыш в энергии 22 кКал/моль и защищает активный центр от действия растворителя. Это, по-видимому, интенсифицирует дипольные взаимодействия и способствует катализу (рассматриваемый процесс является еще одним примером «индуцированного» механизма). Существуют четыре субстрат-связывающих субсайта с каталитическими *GLU*-остатками, ориентированными на противоположные стороны субсайта −1. HIS_{93} располагается при субсайтах −1 и −2 и может проявлять чувствительность к щелочным значениям pH. Этот эквивалент двух мальтозных единиц связывается активным центром (субсайты от −2 до +2). Данное свойство показывает, насколько близко к точкам разветвления в крахмале может действовать фермент. Ранее считалось, что в катализ вовлечены цистеиновые остатки, однако данные, полученные по методу точечных мутаций, это не подтвердили (вместе с тем, эти фрагменты играют определенную роль в обеспечении конформационной стабильности фермента). В отличие от растительных ферментов, не способных связывать и расщеплять сырой крахмал, некоторые микробные ферменты обладают отдельными белковыми доменами, обладающими этой способностью. β-Амилаза подвергается конкурентному ингибированию α-циклодекстрином; очевидно, что медиатором этого процесса является LEU_{383}, образующий комплекс включения и блокирующий доступ к активному центру. β-Амилазы обычно характеризуются более ще-

лочным оптимумом pH (pH 5,0–7,0), чем α-амилазы; они не требуют присутствия Ca^{2+}, а оптимальный температурный диапазон для них составляет 45–70 °C (микробные ферменты более термостойки).

6.3.2.1.3. Пуллуланаза

Пуллуланазы I типа (ЕС 3.2.1.41, пуллулан 6-глюканогидролаза) относятся к «деразветвляющим» ферментам или «предельным декстриназам», так как они гидролизуют декстрины с α-1,6-глюкозидными связями, составляющими точки разветвления амилопектина [131, 141, 147]. Пуллуланаза присутствует во многих бактериях, некоторых дрожжах и злаках. Хотя данные секвенирования свидетельствуют о принадлежности пуллуланазы к 13-му семейству α-амилаз (α→α-удерживающих ферментов), ее структурные особенности до конца не ясны. По-видимому, составляющими активного центра (в качестве примера рассмотрим фермент микроорганизмов *Klebsiella pneumoniae*) являются GLU_{706} (кислота), ASP_{677} (нуклеофил/основание) и ASP_{734} (см. табл. 6.6). Свое тривиальное название пуллуланаза получила благодаря способности воздействовать на пуллулан — повторяющуюся единицу в [α-*D*-*Glc*-(1→4)-α-*D*-*Glc*-(1→6)-α-*D*-*Glc*-(1→4)-α-*D*-*Glc*]. Пуллуланаза может действовать и на фрагменты большие, чем пуллулан (но не на меньшие). Она также медленно действует на амилопектин и несколько быстрее на предельные декстрины, образующиеся на поздних стадиях разжижения и осахаривания крахмала [147]. Продуктами действия пуллуланаз являются линейные глюкоолигосахариды, по длине такие же небольшие, как мальтоза. Эти ферменты получают обычно из бактерий родов *Klebsiella* и *Bacillus*. Их молекулярная масса составляет около 100 кДа, верхняя температурная граница их активности — 55–65 °C, оптимум pH — 3,5–6,5, а требования к кофакторам неизвестны (хотя некоторые пуллуланазы активируются ионом Ca^{2+}). Пуллуланазы растительного происхождения являются примерами предельных декстриназ, самыми богатыми источниками которых являются проросшее и соложеное зерно, особенно соложеный ячмень. Пуллуланазы II типа или амилопуллуланазы (ЕС 3.2.1.41 или 3.2.1.1) имеют в основном микробное происхождение и проявляют комбинированную α-амилазно-пуллуланазную активность, гидролизуя и α-1,4-, и α-1,6-связи в крахмале. Родственными пуллуланазам ферментами являются неопуллуланаза (ЕС 3.2.1.125) и изопуллуланаза (ЕС 3.2.1.57), которые действуют на α-1,4-мостики в пуллулане по направлению соответственно к нередуцированному и редуцированному концам точки разветвления, образуя α-1,6-разветвленные трисахариды — панозу и изопанозу.

6.3.2.1.4. Глюкоамилаза

Глюкоамилаза (1,4-α-*D*-глюкан-глюканогидролаза, ЕС 3.2.1.3, тривиальные название — амилоглюкозидаза) представляет собой α→β-инвертирующий, экзоактивный фермент, входящий в 15-е семейство гликозидаз и гидролизующий линейные участки крахмала до глюкозы с нередуцирующего конца [85, 116, 141]. Хотя глюкоамилаза селективна по отношению к α-1,4-глюкозидной связи, она может медленно действовать на α-1,6-связь, характерную для амилопектина и пуллулана. Единственным продуктом полного глюкоамилазного расщепления является глюкоза.

Структурные и механистические особенности глюкоамилазы аналогичны таковым для α-амилазы, в том числе кислотный GLU_{179} и основный GLU_{400} каталитические остатки (например, в ферменте из *Aspergillus spp.*), а также отдельный крахмалсвязывающий домен и короткий линкерный домен. Некоторые глюкоамилазы могут действовать на нативный гранулированный крахмал. Два остатка $TRP_{52,120}$ способствуют катализу за счет водородных связей с GLU_{179}, повышающих их кислотность. Каталитический домен имеет пять субсайтов, отличных от распадающегося гликонового остатка в позиции −1 (см. рис. 6.15, *а*); все субсайты от +1 до +5 имеют выгодную ($-\Delta G$) свободную энергию связывания, особенно субсайт +1. Так как ΔG для субсайтов увеличивается, этот фермент характеризуется повышенной селективностью к более длинным линейным глюкоолигосахаридам (от С2 до более чем С6). Это способствует полному гидролизу коротких амилозных сегментов до глюкозы. Чтобы получить доступ к активному центру, олигомерный субстрат должен проникнуть в «колодец». Из-за стерических барьеров скоростьлимитирующей стадией вместо гидролиза является диссоциация и повторное связывание остающегося субстрата.

Источниками глюкоамилаз являются преимущественно бактерии и грибы [85]. Молекулярная масса глюкоамилаз составляет 37–112 кДа, причем они могут существовать в нескольких изоформах, не имеют кофакторов, а оптимальными значениями pH и температуры являются соответственно 3,5–6,0 и 40–70 °C. Широкое распространение получила глюкоамилаза из *Aspergillus*, которая наиболее активна и стабильна

при pH 3,5–4,5 и температуре 55–60 °C [141]. Весьма интересна глюкоамилаза *Rhizopus*, поскольку одна ее изоформа способна эффективно гидролизовать α-1,6-точки разветвления [85]. По сравнению с другими модифицирующими крахмал ферментами глюкоамилазы действуют довольно медленно, и это обстоятельство следует учитывать при разработке технологических процессов.

6.3.2.1.5. Цикломальтодекстринглюканотрансфераза

Цикломальтодекстринглюканотрансфераза (тривиальное название — цикломальтодекстринтрансфераза) — *CGT*, 1,4-α-*D*-глюкан-4-α-*D*-[1,4-α-*D*-глюкано]-трансфераза [циклизирующая], ЕС 2.4.1.9 — катализирует гидролиз, а также реакции внутри- и межмолекулярного трансгликозилирования [116, 141, 142]. Продуктами реакций циклизации являются гекса- (α), гепта- (β), и окта(γ)-сахариды, более известные как циклодекстрины. *CGT* представляет собой α→α-удерживающий, эндоактивный фермент 13-го семейства гликозидаз. Помимо трех белковых доменов α-амилазы у него есть два дополнительных белковых домена, включая добавочные субстратсвязывающие (специфичные для мальтозы) сайты. Такое большое число связывающих центров дает возможность взаимодействовать с нативным крахмалом (хотя в этом отношении *CGT* не очень активна) и помогает направить линейные фрагменты крахмала в канавку активного сайта. Эти ферменты микробного происхождения являются обычно мономерами с молекулярной массой около 75 кДа. Каталитическими остатками в случае фермента из *Bacillus circulans* служат ASP_{229} (основание/нуклеофил) и GLU_{257} (общая кислота); ASP_{328} и $HIS_{140,327}$ участвуют в связывании субстрата и стабилизации переходного состояния; ARG_{227} ориентирует нуклеофил, а HIS_{233} координируется с необходимым для катализа Ca^{2+} (как в некоторых α-амилазах). В активном сайте имеется девять субсайтов, от −7 до +2, в соответствии со структурой β-циклодекстрина, основного продукта внутримолекулярной циклизации (см. табл. 6.6).

Несмотря на то что циклодекстрины являются основными промышленно выпускаемыми продуктами, благодаря весьма невысокой селективности этого фермента относительно субстратов и продуктов он способен катализировать различные реакции, в том числе гидролиз, циклизацию, диспропорционирование и соединение. Например, *CGT* может реагировать с глюкозой и крахмалом с образованием мальтоолигосахаридов с различной длиной цепи, а также соединять сахара (в частности, моносахариды) со спиртовыми группами в таких соединениях, как аскорбиновая кислота и флавоноиды. Последние процессы весьма перспективны для пищевых систем, поскольку позволяют получать соединения с уникальными функциональными группами. Оптимум pH рассматриваемых ферментов находится в диапазоне 5–6, а оптимальные температуры в последние годы увеличились с 50–60 до 80–90 °C благодаря использованию термостабильных форм. Применение *CGT* из разных источников дает возможность получать в качестве основного продукта различные циклодекстрины (гекса-, гепта- или окта-олигомеры).

6.3.2.1.6. Промышленное применение трансформации крахмала

Гидролиз крахмала. В промышленности трансформация крахмала начинается с приготовления крахмальной взвеси с содержанием СВ 30–40% и значением pH 4,5 (рис. 6.19). Последующее разжижение при доведении pH до 6,0–6,5 достигается за счет непродолжительного нагревания до 105 °C (для клейстеризации крахмала); затем смесь выдерживают при 90–95 °C в течение 1–3 ч в присутствии термостабильной (бактериальной) α-амилазы и добавленного Ca^{2+} При этом образуется смесь линейных и разветвленных декстринов (мальтодекстринов) со степенью гидролиза 8–15 ДЭ (ДЭ — декстрозный эквивалент), что достаточно для предотвращения образования крахмального геля при нагревании на последующих стадиях (отсюда и термин «разжижение»). Далее возможны три альтернативных варианта. Один из них — это получение мальтодекстринов с ДЭ 15–40 (кукурузного сиропа, использующегося как загуститель или наполнитель, а также для обеспечения требуемой вязкости), осуществляемое путем дальнейшего действия амилазы, причем в некоторых случаях для начального разжижения клейстеризованного крахмала используют соляную кислоту (HCl). Два других варианта используются в производстве подсластителей путем уменьшения температуры до 60 °C и pH до 4,5–5,5 для достижения оптимальных условий для проведения ферментативной реакции. Для получения 95–98%-ного глюкозного сиропа (ДЭ 95) концентрацию СВ снижают до 27–30% и вносят глюкоамилазу (зачастую в иммобилизованном виде) с добавлением или без добавления пуллуланазы, выдерживая в течение 12–96 ч. Полученный глюкозный сироп с концентрацией более 95% затем очищают, концентрируют до содержания СВ 45% и обрабатывают иммобилизованной

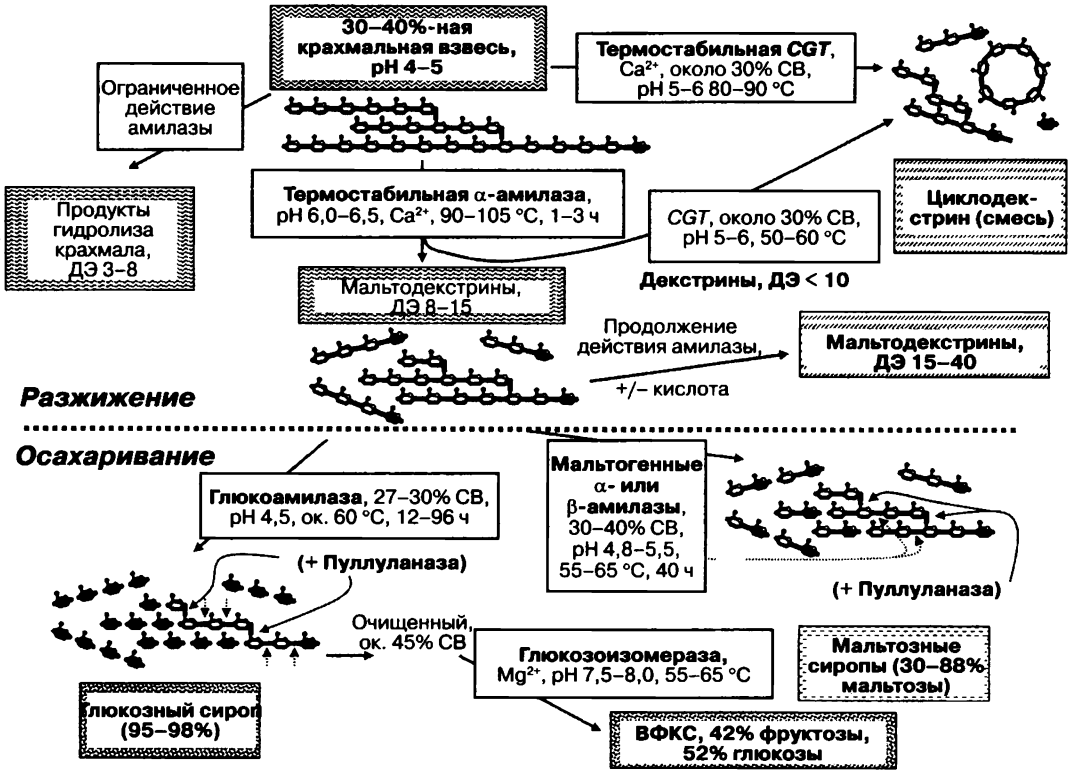


Рис. 6.19. Трансформация крахмала с использованием ферментов в пищевой промышленности. Темными глюкозными единицами обозначены редуцирующие концы, по которым определяется ДЭ

ксилозо(глюкозо)изомеразой при pH 7,5–8,0 и температуре 55–65 °C, добавляя Mg^{2+} для получения высокофруктозного кукурузного сиропа с содержанием фруктозы 42% (52% глюкозы). Впоследствии содержание в нем фруктозы может быть доведено до 55%. Получению из ожиженного крахмала другого подслащивающего вещества (30–88%-ного мальтозного сиропа, использующегося в производстве конфет) способствует добавление грибковых (мальтогенных) α- или β-амилаз с добавлением или без добавления пуллуланазы. Длина мальтоолигосахаридов в смеси обычно составляет от двух до пяти глюкозных единиц и зависит от выбранного источника мальтогенной амилазы.

Из крахмальной взвеси под действием различных α-амилаз, вносимых до нагревания крахмала до точки клейстеризации, получают два других типа неподслащивающих веществ. Тем самым регулируется модель осахаривания (ДЭ 3–8) и степень гидролиза, что дает возможность получать большие декстрины (обычно называемые продуктами гидролиза крахмала), образующие термообратимые гели и обладающие свойствами имитаторов жира. Подробности получения этих продуктов описаны в патентах, но общим является ограниченное использование амилаз в заданном интервале температур [127]. К взвеси нативного крахмала (pH 5–6 температура инкубации 80–90 °C) можно добавлять термостойкую *CGT*. Общий выход циклодекстринов при действии *CGT* обратно пропорционален концентрации крахмала и степени разжижения [147]. Таким образом, в промышленности циклодекстрин зачастую получают при содержании СВ крахмала в смеси около 30% [124]. В патентной литературе сообщается об использовании 1–33% СВ как компромиссе между процентом выхода (эффективностью) и общим выходом (продукцией). Термостабильная *CGT* способна как гидролизовать нативный (клейстеризованный) крахмал в присутствии добавленного Ca^{2+}, так и трансгликозилировать (циклизовать) получающиеся фрагменты. Можно использовать и нетермостойкую *CGT*, однако в этом случае для предотвращения гелеобразования крахмал необходимо подвергнуть ограниченному перевариванию (примерно до ДЭ 10), после чего при пониженной температуре (50–60 °C) добавляют *CGT*. Выход циклодекстринов можно повысить за счет предварительной или одновременной обработки крахмала деразветвляющим ферментом и использования комплексирующих

агентов (растворителей или детергентов), способствующих реакции образования одного или более видов циклодекстринов [124, 147].

Можно сказать, что дальнейшие исследования способов обработки и трансформации крахмала будут сосредоточены на поиске путей увеличения стабильности α-амилазы к pH 4–5 и снижения концентрации требуемого количества Ca^{2+}, а также на повышении эффективности использования β-амилаз при переработке нативного крахмала [85, 131]. Кроме того, повышение термостабильности ферментов может дать существенные технологические преимущества, в частности, возможность проведения одностадийных процессов. Первостепенной задачей остается также поиск факторов, определяющих селективность ферментов.

Хлебобулочные и мучные кондитерские изделия. Фактически все упомянутые выше гликозидазы, особенно α-амилазы, используются в хлебопечении. Ранее считалось, что амилазы «активируют» сбраживаемые углеводы перед действием на них дрожжей. Амилазы добавляли в тесто для расщепления поврежденных зерен крахмала и/или повышения недостаточной активности эндогенной амилазы муки (для хлебопечения). В настоящее время показано, что внесенные в тесто амилазы снижают его вязкость, увеличивают объем хлеба, размягчают мякиш (замедляют черствение) и улучшают цвет корочки. Большая часть этих эффектов обусловлена частичным гидролизом крахмала при выпечке. Понижение вязкости (разжижение) приводит к увеличению объема и улучшению текстуры изделия за счет создания более благоприятных условий для ускорения реакций при кондиционировании теста и выпечке (эффект массопереноса). Считается, что замедление черствения обусловлено частичным гидролизом амилозы и особенно амилопектина, что замедляет скорость их ретроградации. Именно для этого α-амилазы вносят в выпечные изделия*.

Передозировка α-амилаз является основной причиной, почему хлебобулочные изделия становятся «резиновыми» или липкими. Это обусловлено накоплением разветвленных мальтодекстринов со степенью полимеризации 20–100 СП. Таким образом, для каждого изделия следует подобрать оптимальное количество амилазы — после завершения выпечки ее не должно оставаться в продукте, чтобы она не проявляла остаточную ферментативную активность в конечном продукте. Необходимо учитывать термостойкость амилазы и вводить только то ее количество, которое необходимо для конкретного случая [53]. С недавних пор наилучшими агентами, замедляющими черствение, считаются мальтогенные α-амилазы, поскольку они образуют более короткие мальтоолигосахариды (СП 7–9) и длинные декстрины (пластификаторы), чем получающиеся при использовании обычных эндоактивных α-амилаз. Мальтогенные амилазы сохраняют неповрежденной сетку клейстеризованного крахмала в мягком, но не липком хлебобулочном изделии, а небольшое уменьшение длины крахмальных цепочек придает мякишу упругость и одновременно замедляет черствение [26, 95, 131].

Пивоварение и сбраживание. Со времени открытия в 1833 г. «диастатической» активности пророщенных (соложеных) зерен, положившего начало промышленному использованию α- и β-амилаз, крахмальные гидролазы считаются необходимыми в пивоварении. Тем не менее, эндогенных амилаз пророщенных зерен недостаточно для активации всех сбраживаемых углеводов — концентрация этих ферментов невелика, а термостойкость низка. Кроме того, в зерне присутствуют эндогенные ингибиторы, в связи с чем для повышения эффективности сбраживания углеводов используют внесение α- и β-амилаз, глюкоамилазы, пуллуланазы и ферментов, гидролизующих клеточные стенки (почти исключительно микробного происхождения). Глюканазы и ксиланазы (см. ниже) используются для гидролиза глюканов (подобных целлюлозе, но с β-1,3- и β-1,4-мостиками) и ксиланов (преимущественно полимеров ксилозы — основных гемицеллюлозных компонентов клеточных стенок). Добавление α- и β-амилаз используют для завершения расщепления крахмала до α- и β-декстринов, чего невозможно достичь с помощью термолабильных амилаз солода. Эти остаточные предельные декстрины обеспечивают «тело» готового продукта. Вместе с тем предельные декстрины можно сбраживать путем добавления глюкоамилазы и/или пуллуланазы, получая низкокалорийное («легкое») пиво. Экзогенные ферменты вносят на стадии или сразу после получения сусла, проводимого при умеренных температурах (45–65 °С), и при последующем кипячении сусла они разрушаются [141, 142].

---

* Расходы на утилизацию черствых хлебобулочных изделий составили в США в 1990 г. почти 1 млрд долларов [53]. — *Примеч. авт.*

6.3.2.2. Превращения сахаров

6.3.2.2.7. Изомеризация глюкозы

Ксилозо(глюкозо)изомераза (ЕС 5.3.1.5, *D*-ксилозокетолизомераза) широко используется в производстве подслащивающих веществ из кукурузного крахмала; источником этого фермента являются исключительно микроорганизмы [3, 127, 141]. Хотя наибольшей селективностью он обладает по отношению к ксилозе, достаточно эффективно он катализирует равновесную реакцию изомеризации с глюкозой (продуктом здесь является фруктоза), что делает этот фермент одним из наиболее важных ферментов в производстве высокофруктозного кукурузного сиропа (ВФКС). Механизм действия этого фермента и природу его активных функциональных групп мы уже рассматривали в разделе 6.2.4.2. Существует этот фермент в виде гомотетрамеров с молекулярной массой 170–200 кДа и с двумя металлами-кофакторами (каталитическим и структурным) на 1 субъединицу (обычно Mn^{2+}, Mg^{2+} и Co^{2+}). Промышленно производится фермент главным образом из *Streptomyces spp.* В иммобилизованном виде его наносят на колонну, через которую пропускается глюкозный сироп. Для очистки глюкозного сиропа, полученного при осахаривании крахмала (см. рис. 6.19) и содержащего 40–50% СВ (93% СВ составляет глюкоза), используется ион-обменный процесс и обработка активированным углем. Затем значение pH доводят до примерно 7,5 (значения между интервалом максимальной стабильности (pH 5–7) и максимальной активности (pH 7–9), добавляют 1,5 мМ Mg^{2+} и пропускают патоку через реактор (за время, необходимое для достижения нужной степени конверсии при 55–65 °С, хотя оптимальными температурами являются 75–85 °С). Указанный температурный интервал является своего рода компромиссом и определяется необходимостью получить стабильный в течение нескольких недель и мясяцев фермент, снизить его вязкость, а также ограничить рост микроорганизмов и реакции Майяра, инактивирующие фермент. Основным недостатком глюкозоизомеразы, ограничивающим ее промышленное применение, является недостаточная термостабильность. В зависимости от условий глюкозный сироп (ДЭ 95) можно превратить в 42–45%-ный фруктозный сироп. Использование более высоких температур дает возможность получать высокий выход фруктозы (константа равновесия увеличивается с ростом температуры). В настоящее время усилия молекулярных биологов направлены на повышение термостабильности этого фермента.

6.3.2.2.2. Окисление глюкозы

Глюкозооксидазу (ЕС 1.1.3.4, катализирующую окисление молекулярным кислородом полуацетальной ОН-группы β-*D*-глюкозы до карбонильной группы, β-*D*-глюкоза: O_2-1-оксидоредуктазу) получают в основном из *Aspergillus niger* [117, 141]. Она представляет собой димерный гликопротеин молекулярной массой 140–160 кДа, имеющий глубокий «карман», образующий с глюкозой 12 Н-связей и участвующий в гидрофобных взаимодействиях с глюкозой, что обусловливает специфичность этого фермента к глюкозе. Несмотря на то что величина K_M для глюкозы довольно высока (около 40 мМ), это компенсируется высокими «числом оборотов» и скоростью реакции. Этот фермент достаточно стабилен вплоть до температуры 60 °С при pH 4,5–7,5, что позволяет использовать его в различных условиях. Глюкозооксидазу используют, прежде всего, для удаления глюкозы из яичного белка, что уменьшает возможности протекания реакций неферментативного потемнения (реакций Майяра) при дегидратации и хранении. Сначала pH яичного белка доводят лимонной кислотой примерно с 9 до менее 7, после чего вносят глюкозооксидазу вместе с H_2O_2 (из пероксида водорода благодаря присущей этому ферменту каталазной активности выделяется кислород) и долго (до 16 ч) выдерживают смесь при 7–10 °С перед распылительной сушкой [77]. Другие возможности использования глюкозооксидазы (удаление кислорода из жидкостей или из упаковки, получение глюконовой кислоты — продукта кислотной ферментации, химического разрыхлителя) не получили широко распространения. Глюкозооксидазу можно также использовать для получения H_2O_2 — антибактериального агента (в зубных пастах) или улучшителя теста, обеспечивающего образование оксидантов и заменяющего броматы в процессах образования дисульфидных мостиков в глютене [142].

6.3.2.2.3. Гидролиз (инверсия) сахарозы

Инвертаза (ЕС 3.2.1.26, β-*D*-фруктофуранозидфруктогидролаза) изучается уже довольно давно. Именно инвертаза дрожжей была выбрана Михаэлисом и Ментен для исследований кинетики ферментативных

реакций в 1913 г. В настоящее время секвенировано около 40 инвертаз. Они существуют в растительных тканях и микроорганизмах в виде изоформ, являясь мономерными или олигомерными белками с молекулярной массой 37–560 кДа. Многие инвертазы представляют собой гликопротеины; растительные изоформы зачастую относят к инвертазам кислотного и нейтрального или щелочного типа, что отражает условия их оптимальной активности (pH соответственно 4–5 и 7–8). Инвертаза является β→β-удерживающей гликозилтрансферазой; термин «инвертаза» отражает способность этого фермента изменять («инвертировать») плоскость оптического вращения (поляриметрия) раствора сахарозы, но не стереохимию ее действия (см. табл. 6.6). Уникальна стабильность и активность этого фермента при высоких осмоляльностях (вплоть до концентрации сахарозы 30 М). Каталитическими остатками дрожжевого фермента являются GLU_{204} (кислота) и ASP_{23} (нуклеофил/основание). Инвертаза селективна по отношению к β-*D*-фруктофуранозилгликозидам, важнейшим из которых является сахароза. Инвертаза (из дрожжей) используется как экзогенный фермент преимущественно в производстве конфет с мягкой начинкой и искусственного меда из сахарозы. Инвертазу вносят также в глазированные кондитерские изделия либо смешивают с гранулированной помадной массой непосредственно перед глазированием. При отстаивании конфетной массы инвертаза воздействует на сахарозу и размягчает корпус изделия [116, 141].

6.3.2.2.4. Гидролиз лактозы

β-*D*-Галактозидаза (ЕС 1 3.2.1.23, β-*D*-галактозидгалактогидролаза или лактаза) обнаружена в кишечнике млекопитающих и в микроорганизмах. Она относится ко 2-му семейству ферментов — гликозилгидролазам. Эти ферменты обычно существуют в виде тетрамеров, состоящих из полипептидных цепей массой примерно от 90 до 120 кДа. Типичным представителем лактаз является фермент *lacZ* из *Escherichia coli*. Каждая димерная единица обеспечивает Mg^{2+}-связывающий участок и два каталитических остатка (по одному от каждого полипептида), так что у каждого тетрамера есть два активных участка, а связывающий «карман» по виду напоминает глубокую клешню на поверхности полипептидных цепей. Каталитические свойства остатка GLU_{537} (нуклеофил/основание, *E. coli*) доказаны достаточно убедительно (см. табл. 6.6), чего нельзя сказать об общей кислотной каталитической единице(ах). Кислотная группа располагается, по-видимому, внутри кластера из других необходимых для катализа остатков, в том числе GLU_{461}, MET_{502} и TYR_{503}, а также двух $GLU_{416,461}$ и HIS_{418}, которые координируются с Mg^{2+} Предполагается, что или Mg^{2+}, или GLU_{461}, или оба они вместе выполняют роль общего кислотного катализатора. Действию лактазы подвержены многие β-*D*-галактозиды, что указывает на ее выраженную специфичность по отношению к гликоновому остатку (субсайт −1), хотя полных данных по соотношениям субсайтов еще нет. Образование водородных связей между HIS_{540} фермента и С2–ОН, С4–ОН и С6–ОН стабилизирует переходное состояние и способствует проявлению специфичности по отношению к гликону. Специфичность относительно негалактозильного фрагмента способствует широкому использованию модельного хромогенового субстрата — *o*-нитрофенил-β-*D*-галактозида в рутинных анализах активности фермента. Поскольку β-*D*-галактозидаза является β→β-удерживающим ферментом, она также катализирует реакции трансгликозилирования галактозы с другими сахарами (лактозой, галактозой, глюкозой) за счет β-1,6-связывания и образования необычных олигосахаридов со степенью полимеризации 2–5.

Этот фермент микробного происхождения характеризуется широким оптимумом pH (соответственно для фермента из бактерий, дрожжей и грибов — 5,5–6,5, 6,2–7,5 и 2,5–5,0) для промышленного использования. Температурный оптимум для бактериальных и дрожжевых ферментов составляет 35–40 °С, а для грибковых ферментов — до 55–60 °С. Грибковый фермент — это единственная форма, не активируемая ионами Mg^{2+} или Mn^{2+} Такое разнообразие свойств позволяет использовать микробные β-*D*-галактозидазы в кислых пищевых продуктах (в кислой сыворотке и кисломолочных продуктах), а также в молоке и сладкой сыворотке. Ингибируется этот фермент продуктом реакции (галактозой), ионами Ca^{2+} и Na^{+} Гидролиз лактозы используют для усиления сладости, улучшения сбраживаемости субстратов и редуцирования сахаров, а также для предотвращения кристаллизации лактозы (с образованием, например, «песчанности» мороженого). После гидролиза лактозы молочные продукты могут потреблять люди, страдающие непереносимостью лактозы (у таких людей в организме не хватает лактазы, существующей у млекопитающих в виде лактазофлоризингидролазы — фермента с двумя активными центрами и функциями).

В присутствии дрожжевого фермента гидролиз лактозы может протекать в жидком молоке, причем степень гидролиза при этом достигает примерно 70%, а затем фермент при пастеризации разрушается [142]. Для гидролиза лактозы в сыворотке или сывороточном пермеате (степень гидролиза до 90%) используют иммобилизованную β-*D*-галактозидазу из плесеней рода *Aspergillus* [116, 141].

6.3.2.2.5. Прочие гликозидазы

β-Глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21; β-*D*-глюкозидглюкогидролазы) представляют собой разнообразную группу ферментов, входящих в 1 и 3 семейства гликозилгидролаз. β-Глюкозидаза представляет собой β→β-удерживающий фермент, кислотным и нуклеофильным остатками которого служат соответственно GLU_{170} и GLU_{358} (в ферменте из *Alcaligenes faecalis* они находятся на расстоянии 5,5 Å друг от друга, см. табл. 6.6). Источниками β-глюкозидаз могут быть многие микроорганизмы и растения, чаще всего миндаль (фермент из него зачастую называют «эмульсином»). β-Глюкозидазы стабильны в широком интервале pH (4–10), а наиболее активны они при pH 5–7 в зависимости от источника. Верхняя температурная граница — 40–50 °C, и поскольку этот фермент чувствителен к сульфгидрильным реагентам (что объясняет стабилизирующую роль цистеина), компактность его структуры обеспечивает достаточно высокую устойчивость к протеолизу. β-Глюкозидазы способны гидролизовать сахара (например, целлобиаза — целлобиозу), а также тиогликозиды и β-*D*-глюкозиды алкильных и арильных групп, входящих в состав агликона. Действие на β-глюкозиды арильных групп приводит к образованию ароматических веществ в напитках на основе фруктов (в винах и соках) и чае [141, 143]. β-Глюкозидазы способствуют также удалению из соков цитрусовых горького, обусловленного нарингином привкуса; это свойство может быть характерно и для препаратов пектиназы, применяющихся в производстве фруктовых экстрактов и соков. В присутствии некоторых эндогенных β-глюкозидаз наблюдается выделение биоактивных соединений, например, HCN из цианогенных глюкозидов — из линамарина (в кассаве и лимской фасоли), дуррина (в сорго), амигдалина (в косточках миндаля, персиков и абрикосов), а также антиканцерогенных и «зобогенных» изотиоцианатов из глюкозинолатных субстратов растений рода *Brassica*, обладающих едким горьким вкусом (за счет фермента мирозиназы, см. далее). Хотя некоторые гликозидазы в «пектиназных» препаратах способствуют образованию ароматических веществ из предшественников в ходе обработки фруктовых соков, возможны и негативные эффекты, в частности, утрата обусловленной антоцианинами окраски и возникновение привкуса гнили, обусловленного образованием феруловой кислоты [143].

Изомальтулозосинтаза обладает свойствами гликозилгидролазы, а также катализирует реакцию трансгликозилирования. Нуклеофильно/основным и кислотным центрами в этом ферменте из *Klebsiella spp. LX3* являются соответственно ASP_{241} и GLU_{295} [150]. Двухстадийная реакция включает сначала стадию гидролиза сахарозы (α-*D*-глюкозил-1,2-β-*D*-фруктозы) и последующее гликозилирование фруктозы по С6–ОН с образованием изомальтозы (α-*D*-глюкозил-1,6-β-*D*-фруктозы). Обе стадии реакций протекают в одном и том же активном центре, и конечным ее итогом является изомеризация. В промышленности для синтеза изомальтулозы (изомальтозы, неканцерогенного подслащивающего вещества, потенциального пребиотика и предшественника дисахаридного сахарного спирта *Isomalt*®) используются иммобилизованные бактериальные клетки [16].

β-Галактозидаза (ЕС 3.2.1.22) применяется для превращения раффинозы, присутствующей в сахарной свекле, в сахарозу, что способствует увеличению выхода продукта на 3% и улучшению рекристаллизации сахарозы. Промышленно выпускаемый фермент получают из мицелиальных гранул грибов *Mortierella vinacea* [16].

6.3.2.3. Ферментативные превращения пектина

Известны три типа расщепляющих пектин ферментов — полигалактуроназа, пектат- и пектинлиазы, а также пектинметилэстераза. Специфические реакции, катализируемые этими тремя ферментами, показаны на рис. 6.20 [11, 91]. Встречаются данные ферменты в растениях и микроорганизмах, особенно в грибах, и существуют в нескольких изоформах. Указанные ферменты составляют так называемые «пектиназные» препараты (зачастую из *A. niger*), которые используют при переработке фруктов и овощей, а также при экстракции и осветлении соков [141].

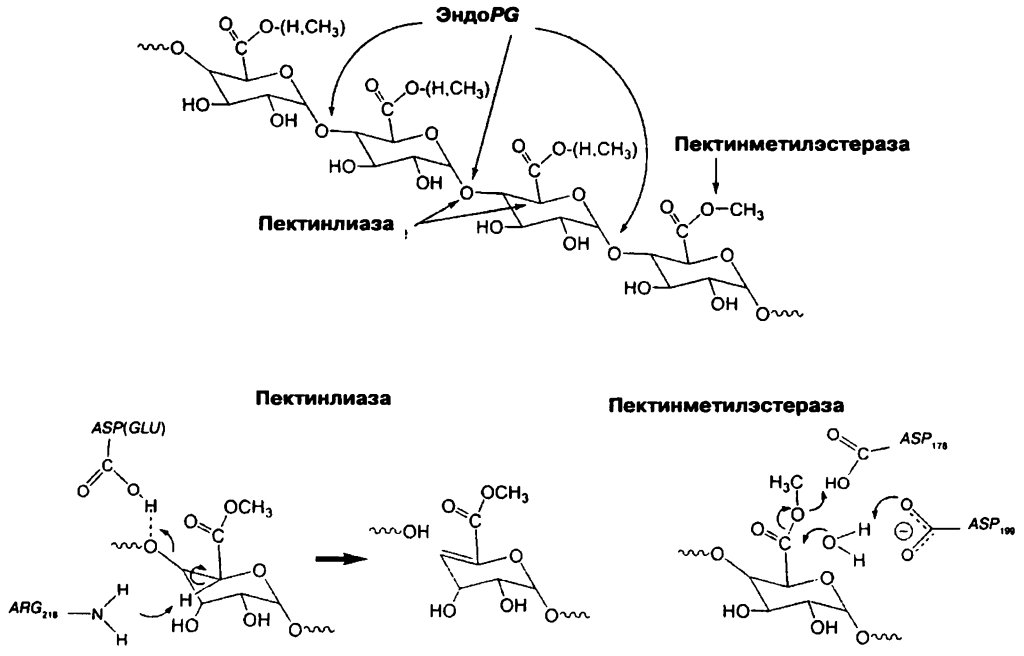


Рис. 6.20. Участок действия и механизм реакции расщепляющих пектин ферментов. По [11, 91, 141]

6.3.2.3.1. Полигалактуроназа

Полигалактуроназы (галактуронид-1,4-α-галактуронидаза, ЕС 3.2.1.15 для эндоактивной формы, ЕС 3.2.1.67 и 3.2.1.82 — для экзоактивных форм) представляют собой α→β-инвертирующие ферменты, относящиеся к 28-му семейству гликозилгидролаз (см. табл. 6.6) [11, 91, 141]. Эндофермент из *A. niger* имеет три сохранившихся остатка $ASP_{180,201,202}$, действующие как общие кислотно-основные каталитические единицы, находящиеся друг от друга на расстоянии 4,0–4,5 Å, а не 9,0–9,5 Å, как у инвертирующих гликозидаз. Считается, что $ASP_{180,201}$ активирует воду как нуклеофил, а ASP_{202} протонирует отщепляемую группу, действуя совместно с HIS_{223} (также сохранившейся); катализу способствует сохранившийся TYR_{291}. У полигалактуроназ существуют 4–6 субстратсвязывающих субсайтов (от −5/−3 до +1 в зависимости от изоформы), что соответствует эндоактивной природе фермента и объясняет минимальный размер молекулы субстрата. Изоформы с наиболее ярко выраженными связывающими свойствами (сродство) при −5-м субсайте не реагируют случайно, а действует последовательно, повторно связывая и повторно гидролизуя одну и ту же цепь. Для −1-го субсайта важен LYS_{258}, связывающий *GalpA*-фрагмент субстрата (неэтерифицированный) за счет ионного взаимодействия с карбоксилатной группой.

Грибные ферменты наиболее активны при pH 3,5–6,0 (тот же интервал pH характерен для ферментов растительного происхождения) и температуре 40–55 °C; их молекулярная масса составляет от 30 до 75 кДа. Под действием полигалактуроназы происходит деполимеризация пектина и постепенная солюбилизация полиуронидных фрагментов. В результате действия этого фермента разрушаются межклеточные барьеры (срединная ламелла) и уменьшается вязкость растворов пектина. Грибные экзополигалактуроназы применяются в ограниченном масштабе, так как при присоединении метилированной галактуроновой кислоты к субсайту +1 они неактивны, и на деполимеризацию пектина и вязкость его растворов такие ферменты практически не влияют.

6.3.2.3.2. Пектинэстераза

Наиболее полно охарактеризованы пектинметилэстеразы (ЕС 3.1.1.11, пектинпектилгидролаза) грибов, хотя они встречаются также и в растительных тканях [91, 141]. Ферменты из одного и того же источника могут существовать в различных изоформах (кислой, нейтральной, щелочной), их молекулярная масса — 25–54 кДа, и они стабильны в широком интервале значений pH (обычно 2–10) при температурах 40–70 °C

(в зависимости от источника). Ферменты грибов имеют оптимум pH 4–6, тогда как у растительных ферментов pH-оптимум сдвинут в шелочную область (pH 6–8), зачастую для них необходимы субмиллимолярные количества Na^+ Поскольку данные ферменты являются карбоксилэстеразами, предполагают, что функциональные группы, участвующие в катализе, и механизм их действия напоминает триаду *ASP-HIS-SER* липаз и сериновых протеаз. Вместе с тем, в ферменте из *Erwinia chrysanthemi* каталитически активны $ASP_{178,199}$ и ARG_{267}. Один *ASP* (депротонированный) активирует нуклеофильную воду, воздействующую на карбонильный углерод, а второй *ASP* (кислый) протонирует карбонильный кислород (см. рис. 6.20). При этом образуется нековалентный тетраэдрический интермедиат, при дальнейшем разрушении которого образуются свободная кислота и метанол. Исследования фермента из *A. niger* подтвердили наличие от 4 до 6 гликонсвязывающих участков, а также невозможность деметилирования при нередуцированном конце пектинового фрагмента. Селективность пектинметилэстераз и их изоформ относительно субстрата или продукта зависит от степени метилирования пектинового субстрата и от того, протекает ли последовательный гидролиз на одной пектиновой цепи, на близко расположенных сайтах или случайным образом.

6.3.2.3.3. Пектатлиаза

Деполимеризуют пектин также пектатлиаза (ЕС 4.2.2.2, (1→4)-α-*D*-галактуронанлиаза) и пектинлиаза (ЕС 4.2.2.10, (1→4)-6-О-метил-α-*D*-галактуронанлиаза), при этом первая распознает кислые фрагменты, примыкающие к разрывающейся связи, а вторая — соседние с ней метил-этерифицированные остатки (атакуемый галактуронатный фрагмент располагается на +1-м субсайте) [141]. Оба фермента существуют в различных изоформах. Для координации галактуронатной группы в активном центре пектатлиазе необходим ион Ca^{2+} Большинство таких ферментов обнаруживаются в грибах, но они встречаются и в бактериях (наиболее известны ферменты *E. chrysanthemi*), тогда как в растениях они встречаются очень редко. pH-Оптимум пектатлиаз часто находится в щелочной области (8,5–9,5), причем наиболее предпочтительными субстратами являются низкометоксилированные пектины. Пектинлиазы имеют pH-оптимум около 6; действуют они в основном на кислые (протонированные) или полностью метоксилированные формы пектинов (наиболее доступными их источниками являются *Aspergillus spp*). Хотя присутствие Ca^{2+} для пектинлиаз не является обязательным, этот катион стимулирует активность ферментов и сдвигает оптимум pH в более кислую область. Обе лиазы стабильны вплоть до температуры около 50 °С. Сохранившийся ARG_{218} (из *E. chrysanthemi*) действует как основание, отщепляющее протон от С5 (см. рис. 6.20); роль кислотной группы пока не выяснена. Экзо-активные ферменты имеют небольшие субсайты (до –1 или –2 по направлению к к нередуцирующему концу), тогда как у эндо-активных ферментов топография субсайтов иная — от –2/+2 до –7/+3 в зависимости от изоформы. Из-за ограничений, связанных со значением pH тканей овощей и особенно фруктов, использующихся для получения соков, большее промышленное применение получили пектинлиазы, а не пектатлиазы.

6.3.2.3.4. Применение ферментов, расщепляющих пектин

Чаще всего препараты пектиназ и родственных им ферментов используют при вымачивании и разжижении тканей, для повышения выхода или экстракции в производстве соков и растительных масел, для осветления и для очистки соков цитрусовых от остатков кожуры [3, 48, 77, 141, 142]. Промышленно выпускаемые неочищенные препараты пектиназ в настоящее время зачастую представляют собой смеси пектин-, целлюлозо- и гемицеллюлозорасщепляющих ферментов, а в будущем будут созданы более специфические по составу и спектру действия препараты. В большинстве случаев ферментативную обработку проводят при температуре 20–30 °С в течение нескольких часов (при умеренных режимах), а при более жестких режимах (при вымачивании и разжижении) — в течение 1–2 ч при 40–50 °С и значениях pH, характерных для данного сока или экстракта. Обработка растительных тканей начинается с измельчения до крупных частиц или растирания (рис. 6.21) [48, 77, 142]). Затем вводят ферментные препараты, гидролизующие и деполимеризующие срединную ламеллу (пектиновые вещества), в результате чего высвобождаются отдельные клетки с неповрежденными стенками (рис. 6.21, *А*). Наиболее подходящим для этого процесса ферментом представляется эндополигалактуроназа, но применяются также и эндопектинлиазы. Полученную суспензию используют для получения соков с мякотью, продуктов детского питания, а также ингредиентов для других пищевых продуктов.

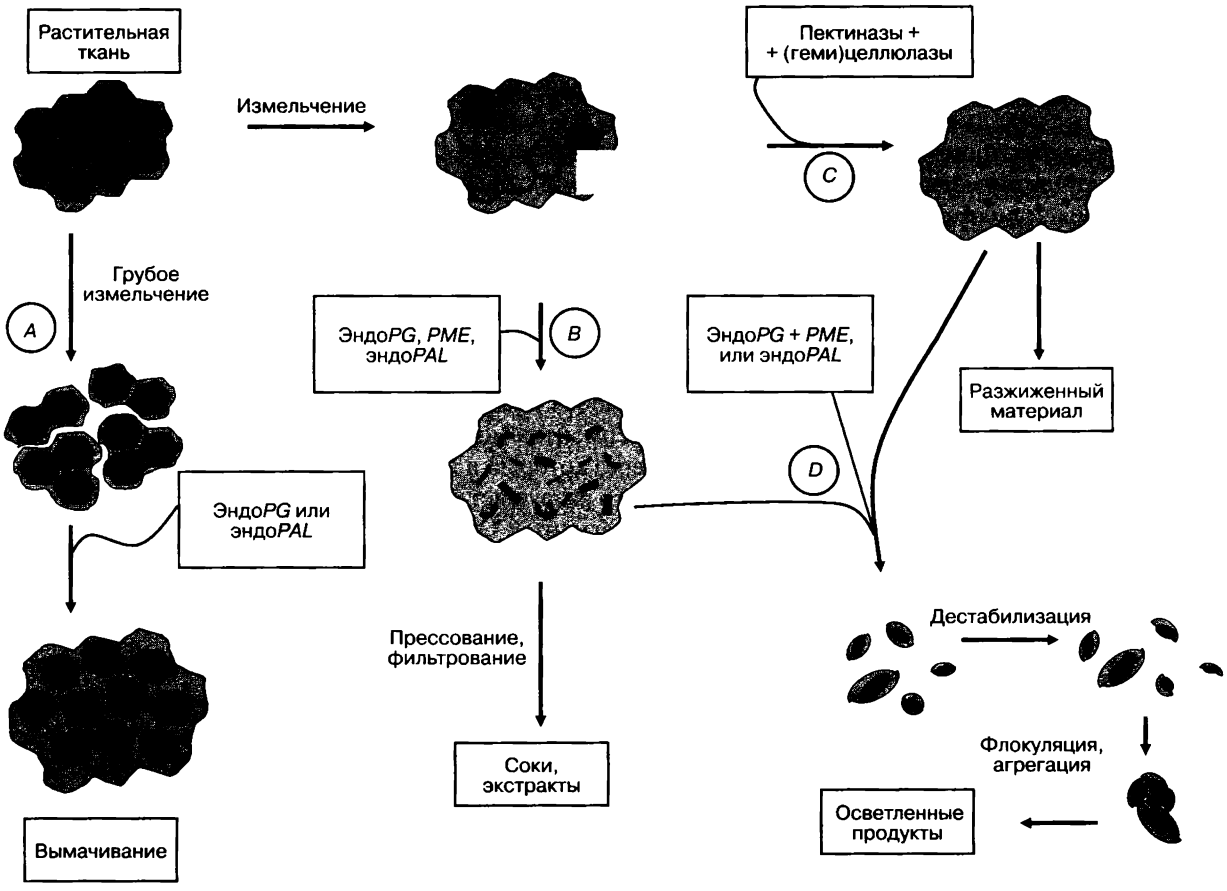


Рис. 6.21. Промышленная переработка фруктовых и овощных экстрактов с использованием пектиназ. По [48, 77, 142]

Другие технологические потоки начинаются с более тонкого измельчения или растирания тканей (зачастую в молотковой дробилке) в целях максимального удаления влаги, иногда с мякотью. Иногда для превращения вязкой массы в полужелированную фруктовую пульпу семечковых фруктов и ягод в смесь добавляют ферменты, вызывающие частичную солюбилизацию пектинов и повышающие влагоудерживающую способность (ВУС) СВ, — это необходимо для улучшения экстракции при прессовании (см. рис. 6.21, *B*). На этой стадии используют пектинрасщепляющие ферменты, деполимеризующие и разлагающие высокометоксилированные пектины, особенно эндополигалактуроназу и пектинметилэстеразу, но применяют также эндопектинлиазу. В зависимости от вида сырья и типа ферментов можно получать как осветленные (прозрачные), так и неосветленные (с мякотью) соки.

Разжижение фруктового или овощного сырья используют для получения жидкого продукта без применения операций фильтрования и прессования (рис. 6.21, *C*). Для этого вводят сложную смесь ферментов, состоящую из пектиназ (полигалактуроназы, пектинметилэстеразы и пектинлиазы), целлюлаз (экзо- и эндо-β-глюканазы) и гемицеллюлаз, действующих на ксиланы, маннаны, галактаны и арабинаны. Как только большая часть (примерно 80%) срединной ламеллы и материала клеточных стенок «солюбилизируется», под действием осмотического давления происходит разрыв клеточной стенки с высвобождением жидкости. Такое разжижение применяют для получения осветленных и неосветленных соков и экстрактов из мясистых тропических фруктов (манго, гуавы, бананов), оливок и яблок.

В заключение рассмотрим процессы ферментативного осветления соков и экстрактов (рис. 6.21, *D*). Для некоторых соков (например, апельсинового) желательна некоторая мутность, а для некоторых (яблочного и виноградного) она нежелательна. Непрозрачность сока обусловлена присутствием белковых колло-

идных частиц (положительно заряженных при pH сока), покрытых пектином (остатки галактуроновой кислоты частично диссоциированы и заряжены отрицательно). Ферменты, деполимеризующие пектин, солюбилизируют и разрушают пектиновый слой, давая возможность белку электростатически взаимодействовать с пектиновыми слоями других частиц, что приводит к агрегации, флокуляции и осветлению. Наиболее эффективно этот процесс протекает при значениях pH около 3,6. Чаще всего для осветления используют пектинметилэстеразу, особенно в сочетании с эндополигалактуроназой, или пектинлиазу (для высокометоксилированных пектинов яблок). Роль пектинметилэстеразы состоит в предоставлении участков для Ca^{2+}-индуцированной «сшивки» частиц, приводящей к агрегации, что способствует их выпадению в осадок. В некоторых случаях осветленные соки могут снова становиться непрозрачными — это характерно для полисахаридных веществ, в основном (на 90%) состоящих из арабинозы. Для осветления таких соков следует использовать эндоарабинаназу.

При производстве сока цитрусовых (в частности, апельсинового) пектиназы используют в промывке фруктовой массы (для снижения вязкости оставшейся после экстракции массы перед ее возвратом в начальный отжатый из тканей сок). С помощью ферментов можно также очистить цитрусовые от кожицы, для чего на поверхности плода делают надрез, через который в течение 1 ч вводят вакуумно-инфузионным методом пектиназу при температуре 20–40 °C. Это разрушает белую кожицу (флаведо) и облегчает после ее удаления разделение «очищенного» плода на сегменты. Особенности ферментативной обработки различных фруктов описаны в работе [142].

6.3.2.4. Прочие гликозидазы

Ксиланазы (ЕС 3.2.1.8, β-1,4-*D*-ксиланксилогидролаза) являются в основном β→β-удерживающими гликозидазами 10-го и 11-го семейств (и ряда других), гидролизующими линейные β-1,4-связанные полимеры ксилозы (с различными замещающими группами, например арабинозу) [116, 141] (см. табл. 6.6). Известен ряд изоформ этих ферментов, которые могут быть как эндо-, так и экзо-активными (первые более важны для пищевых технологий). Ксиланы — это основной компонент гемицеллюлозы, составляющие вместе с целлюлозой основной материал клеточных стенок растений. Ксиланазы обнаружены в растениях (особенно в злаковых культурах), бактериях и грибах. Их молекулярная масса составляет 16–40 кДа. У фермента из *B. circulans* имеются следующие каталитические остатки: GLU_{78} (нуклеофил) и GLU_{172} (общая кислота/основание); pK_a GLU_{172} свободного фермента составляет 6,7, а в связанной с субстратом форме — 4,2. Для ксиланазы А из *Pseudomonas fluorescens* характерна субсайтная топография субстрата от −4 до +1. В общем случае субсайты содержат от 4 до 7 остатков. Источниками бактериальных ферментов являются *Bacillus, Erwinia* и *Streptomyces spp.*, ферменты грибов получают из *Aspergillus* и *Trichoderma spp.* Оптимум pH бактериальных ферментов составляет 6,0–6,5, а из грибов — 3,5–6,0 (в зависимости от источника). Большинство ксиланаз стабильны в широком диапазоне pH (от 3 до 10). Оптимальный интервал температур для активности составляет 40–60 °C.

Ксиланазу целесообразно использовать для деполимеризации не экстрагируемого водой арабиноксилана с образованием водорастворимых пентозанов, обладающих высокой влагоудерживающей способностью (ВУС) [95]. Это обеспечивает увеличение вязкости теста и повышение его эластичности, получение сильной клейковины и, в конечном итоге, увеличение объема изделия. Использование слишком больших количеств ксиланаз или добавление ксиланаз, действующих преимущественно на водорастворимые арабиноксиланы, либо не дает вообще никакого эффекта, либо приводит к получению липкого теста (из-за чрезмерно разложения влагоудерживающих пентозанов), что нежелательно. Совместное использование амилаз и ксиланаз имеет большое значение в производстве замороженного теста [42].

Эндо-ксиланазы относятся к гемицеллюлазам и используются при обработке фруктов и овощей. Ксиланазы применяют также в пивоварении для снижения вязкости сусла, что облегчает проведение стадии сепарации и фильтрации, снижает образование мути и несколько увеличивает выход продукта. Гемицеллюлазы и ксиланазы из *Trichoderma* и *Penicillium spp.* нашли применение в процессе мокрого помола для отделения в зерне (особенно пшеницы) крахмала от глютена [48].

К другим важным ферментам, разлагающим клеточные стенки, относятся ферменты, гидролизующие β-1,4 и β-1,3-связи в глюканах — целлюлазы и глюканазы [141]. Внесение этих ферментов облегчает разжижение тканей фруктов и овощей, повышает содержание сбраживаемых сахаров в используемых в пи-

вовании зерновых, облегчает отделение пивной дробины от сусла и снижает вероятность образования «глюкановой мути» [3, 142].

Выше мы уже рассматривали механизм действия лизоцима (см. уравнение 6.8 и рис. 6.15, *b*), который является α→α-удерживающей гликозидазой (природа его активных сайтов и субсайтов установлена достаточно надежно, см. табл. 6.6). Этот фермент можно использовать как антимикробный агент, особенно против грамположительных микроорганизмов [141]. Лизоцим — это один из самых маленьких белков (его молекулярная масса — 14 кДа), и наиболее известным его источником является белок куриных яиц. Лизоцим в слабокислых средах стабилен. Поскольку при хранении значение pH куриного белка повышается примерно до 9, активность лизоцима со временем падает. Лизоцим применяется как антисептик при производстве сыра [142]; в некоторых сырах он также препятствует газообразованию под действием *Clostridium spp.* [3, 48].

6.3.3. Ферменты, катализирующие превращения белков

Ферменты, катализирующие гидролиз белков, называют протеиназами или протеазами. Можно использовать оба этих термина, однако правильнее их называть экзо- или эндо-пептидазами. Протеазы относятся к наиболее хорошо изученным ферментам, что обусловлено важной ролью протеаз в пищеварительной системе человека и длительной историей их промышленного применения (Кристиан Хансен еще в 1874 г начал выпускать сычужный телячий фермент «реннет», применяемый в производстве сыра) [141]. Пептидазы, преобразующие пищевые белки *in situ* или при их добавлении к белкам, относят к одному из четырех классов, которые мы рассмотрим далее.

6.3.3.1. Сериновые протеазы

Первыми исследованными протеолитическими ферментами стали сериновые протеазы, секретируемые поджелудочной железой, — трипсин (EC 3.4.21.4), химотрипсин (EC 3.4.21.1) и эластаза (EC 3.4.21.37), что обусловлено их ролью в пищеварении и усвоении нутриентов. Сериновую протеазу субтилизин (из *B. subtilus*) мы уже рассматривали как пример фермента, действующего по нуклеофильному механизму с помощью системы с переключением заряда (см. рис. 6.4). Большинство ферментов этой группы имеет молекулярную массу 25–35 кДа, а их субстратсвязывающий участок имеет форму желобка или клешни. Протеазы селективно распознают или N-терминальный фрагмент (P_1), как в случае указанных выше ферментов поджелудочной железы, или C-терминальный (P'_1) остаток, в состав которого входит разрывающаяся пептидная связь. Субтилизины из *Bacillus spp.* используют при получении белковых гидролизатов; они селективны по отношению ко многим аминокислотам с пептидной связью (S_4/P_4-взаимодействие влияет также на селективность). Эндопептидазы поджелудочной железы применяют достаточно широко (структуру определяющих их селективность фрагментов см. на рис. 6.14).

6.3.3.2. Аспарагиновые (кислотные) протеазы

Аспарагиновые протеазы имеют два консервативных аспарагиновых остатка (*ASP*) в каталитическом центре; эти протеазы активны в кислой среде (pH 1–6), а оптимальный диапазон pH составляет от 3 до 4 [141]. К наиболее известным представителям этой группы ферментов относятся пищеварительный фермент пепсин, телячий химозин, используемый в производстве сыра и называемый также «реннином» или «реннетом», катепсин, использующийся при тендеризации мяса после убоя, и химозин-замещающие пептидазы из *Mucor spp.* Эти эндопептидазы обычно имеют молекулярную массу 34–40 кДа и представляет собой мономеры с двумя протеиновыми доменами, разделенными глубоким субстратсвязывающим «карманом». В процессе гидролиза диада из двух фрагментов аспарагиновой кислоты (в химозине — $ASP_{34,216}$), действующих как общая кислота/основание, образует нековалентный интермедиат (рис. 6.22) [116]. Кислотный *ASP*-фрагмент служит донором H^+ и активирует пептидную группу C=O, тогда как *ASP*-карбоксилатный фрагмент присоединяет H^+, повышая тем самым нуклеофильность воды. Затем этот нековалентный тетраэдрический амидногидратный интермедиат перегруппировывается в цвиттер-ион, причем непосредственно перед образованием продуктов гидролиза и сохранением исходного фермента фрагменты аспарагиновой кислоты меняются ролями. Аспарагиновые протеазы катализируют также реакции транспептизации, однако механизм этих процессов пока не изучен.

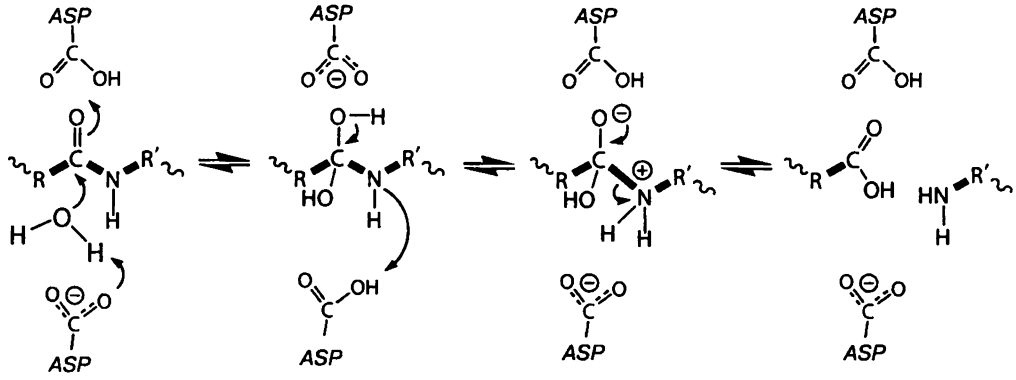


Рис. 6.22. Механизм действия аспарагиновых протеаз. По [116]

По своей селективности в процессах гидролиза белков аспарагиновые протеазы весьма похожи — они распознают неполярные фрагменты (ароматические, *LEU*) с широкой селективностью (включая *ASP* и *GLU*) при субстратном сайте P_1. Уникальную специфичность химозина по отношению к аналогам каппаказеина мы уже отмечали выше (см. табл. 6.4).

6.3.3.3. Цистеиновые (сульфгидрильные) протеазы

Цистеиновые протеазы представляют собой многочисленную группу ферментов (известно более 130 представителей) животных, растений и микроорганизмов [116, 141]. Большая их часть относится к семейству папаина, а среди других следует отметить химопапаин (ЕС 3.4.22.6) с многочисленными его изоформами и карикаин (ЕС 3.4.22.30) из смолы *Carica papaya*; актинидин (ЕС 3.4.22.14) из киви и крыжовника; фицин (ЕС 3.4.22.3) из смолы фигового дерева; бромелаин (ЕС 4.3.22.4) из ананаса, а также лизосомальные катепсины из животных тканей [141]. Уникальной цистеинпротеазной системой мышечной ткани является калпаин и его многочисленные изоформы. Этот имеющий две субъединицы фермент, активируемый ионом Ca^{2+}, участвует в процессе тендеризации мяса после убоя. Ферменты данной группы обычно имеют молекулярную массу от 24 до 35 кДа, а оптимальный диапазон pH для них составляет 6,0–7,5. Они выдерживают нагревание до 60–80 °С, что объясняется наличием трех дисульфидных связей. Консервативные остатки (папаина) включают ионно-парную каталитическую единицу, формируемую CYS_{25} и HIS_{159} при участии ASN_{175}, а GLN_{19} способствует стабилизации оксианионного интермедиата. В формировании активного центра участвует два белковых домена, предоставляя по одному аминокислотному остатку для образования ионной пары, располагающейся в глубокой «щели» между двумя доменами. Механизм действия этого фермента уникален тем, что нуклеофильный и общий кислотный катализ осуществляется через тиолат-имидазолиевую ионную пару (рис. 6.23) [116]. Тиолатная (RS^-) группа атакует электрофильный амидный углерод, образуя промежуточный ковалентный оксианион, стабилизированный NH-группой аминокислот CYS_{25} и GLN_{19}. Протонирование уходящей аминогруппы HIS_{159} общей кислотой приводит к образованию тиоэфирного интермедиата, который затем замещается активированной HIS_{159} водой (через промежуточное образование другого тетраэдрического интермедиата). На приводимом рисунке не показана роль ASN_{175}, амидный кислород которого образует Н-связи с имидазольным $N^{\varepsilon 2}$ атомом HIS_{159}. Цистеиновые протеазы имеют сходную гидролитическую избирательность — они обладают широкой селективностью по отношению к пептидным связям, образуемыми многими кислотами, особенно ароматическими и основными аминокислотами при P_1, и к неполярным остаткам (особенно *PHE*) при P_2 пептидного субстрата (рис. 6.13).

6.3.3.4. Металлопротеазы

Металлопротеазы являются четвертым классом протеолитических ферментов. К наиболее известным ферментам этого класса относятся экзо-активная карбоксипептидаза А (пищеварительный фер-

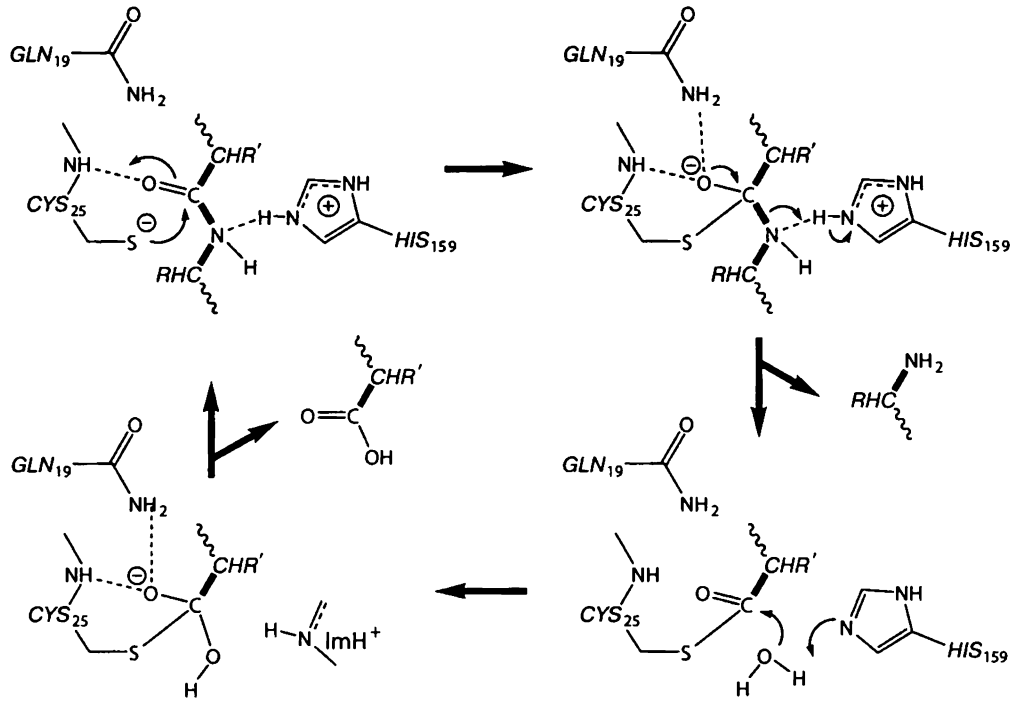


Рис. 6.23. Механизм действия цистеиновых протеаз. По [116]

мент — пептидил-*L*-аминокислотная гидролаза, ЕС 3.4.17.1), эндо-активный термолизин (из *Bacillus thermoproteolyticus,* ЕС 3.4.24.27), впервые изолированный из японского горячего источника, и нейтральная эндо-протеаза из *Bacillus amyloliquefaciens* [141]. Большинство металлопротеаз, соответствующих требованиям пищевой промышленности, являются экзо-активными и требуют присутствия Zn^{2+} Класс металлопротеаз состоит из пяти семейств в зависимости от насыщенного гистидином металлсвязывающего фрагмента с остатком глутаминовой кислоты; белковая часть этих ферментов имеет молекулярную массу 15–87 кДа. И карбоксипептидаза А (87 кДа), и термолизин (35 кДа) имеют гидрофобные «карманы», связывающие преимущественно неполярные и ароматические аминокислоты боковых цепей (особенно *LEU, PHE*), располагающиеся при субстратном субсайте P'_1. В карбоксипептидазе имеется маленькая «дырка», частично образованная ARG_{145} и ASN_{144} в S'_1-субсайте и обусловливающая С-терминальную, экзо-активную природу этого фермента за счет координации с P'_1–COO^--группой. У эндопептидазы термолизина нет такого стесненного связывающего кармана, как у карбоксипептидазы, и он может принимать более длинный сегмент пептида. Для металлопротеаз предложен унифицированный механизм, оставляющий, однако, место для вариаций аминокислотных остаков, участвующих в катализе [116]. В термолизине Zn^{2+} координируется с OH/H_2O (pK_a комплекса составляет около 5), которые замещаются связываемым субстратом (рис. 6.24) [116]. HIS_{231} действует как общий основный катализатор с pK_a около 8 и активирует нуклеофильную воду («помогает» ему в этом ASP_{226}). Ранее считалось, что GLU_{143} выполняет роль каталитического основания, однако в настоящее время полагают, что он электростатически стабилизирует δ^+C–O-тетраэдрический интермедиат, образуемый разрывающейся пептидной связью; Zn^{2+} также координируется с карбонильным δ^-O этой связи. Распад интермедиата на заключительной стадии переводит активный центр в исходное состояние. Отсутствие *HIS* в карбоксипептидазе А компенсируется способностью терминальной карбоксигруппы субстрата активировать нуклеофильную воду (такой катализ субстратом встречается довольно часто). Другие особенности механизма действия карбоксипептидазы А аналогичны термолизину. Хотя свойства карбоксипептидазы как экзо-пептидазы могут быть обусловлены присутствием небольшого гидрофобного связывающего кармана; важную роль также может играть проявление субстратом функций общего основания.

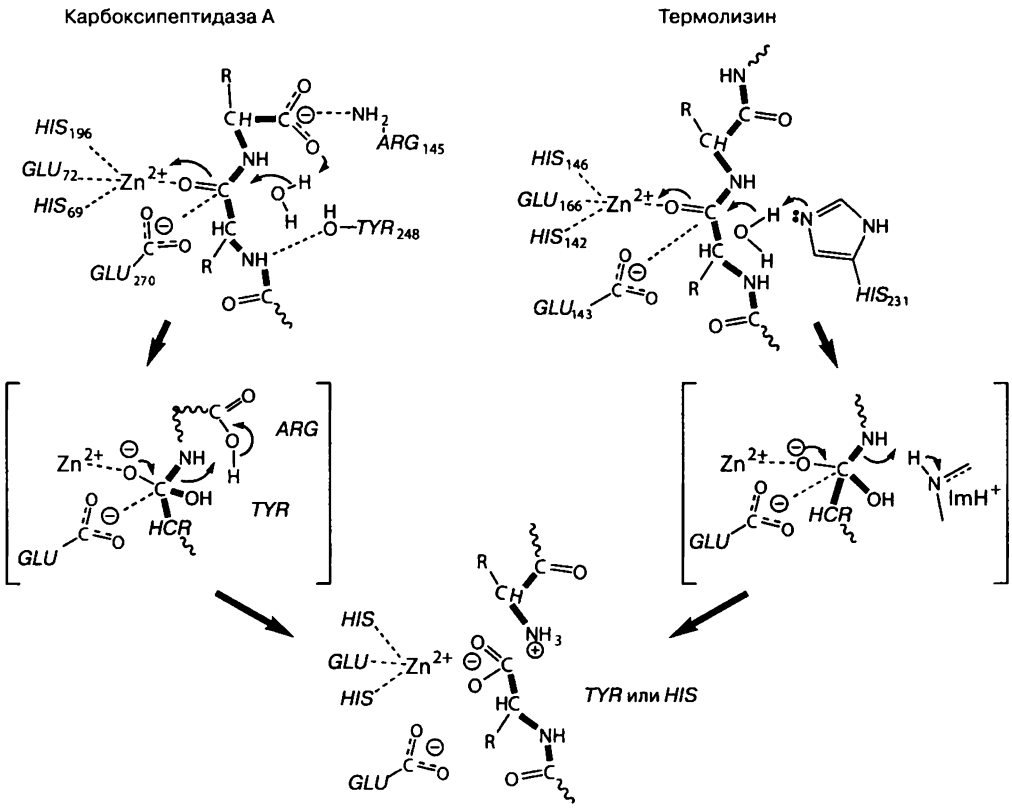


Рис. 6.24. Механизм действия металлопротеаз. По [141]

6.3.3.5. Использование протеолитического эффекта

В промышленности используются коммерческие препараты протеаз различной степени чистоты. Некоторые из них содержат несколько протеолитических ферментов (например, препараты из *Aspergillus spp.*). В зависимости от области применения требуется либо узкая, либо широкая селективность (последняя достигается применением смеси протеаз). Во многих случаях протеазы, секретируемые микроорганизмами (как присутствующими случайно, так и вносимыми специально) существенно влияют на протеолиз в пищевом матриксе [77, 141, 142]. Наиболее важные области применения протеолитических ферментов мы рассмотрим далее.

6.3.3.5.1. Белковые гидролизаты

Гидролиз белков пептидазами проводят для улучшения пищевых, органолептических, физико-химических (пенообразующих, эмульгирующих, гелеобразующих, а также растворимости) свойств, текстуры продуктов, а также для снижения аллергенности [77, 141] (примеры были приведены в главе 5).

Обычно белковый изолят обрабатывают определенной эндо-пептидазой в течение нескольких часов, после чего фермент инактивируется нагреванием. Наиболее важными факторами, влияющими на выбор белка, являются себестоимость и функциональные свойства фермента, его аминокислотный состав и отчасти первичная структура белка (если она известна). Эти факторы следует рассматривать во взаимосвязи с известной селективностью эндо-пептидазы, особенно если необходимо провести гидролиз по определенным участкам. Кроме того, следует учитывать и требования к значению pH и температуре обработки. Эндо-пептидазы обычно используют для быстрого снижения средней молекулярной массы пептидов, тогда как экзо-пептидазы — для гидролиза небольших олигопептидов до смеси аминокислот.

Белки, содержащиеся в мясе, молоке, рыбе, пшенице, овощах, бобовых и дрожжах, можно подвергнуть предварительной обработке, приводящей к частичной денатурации белка, что улучшает доступ к ним пеп-

тидаз и повышает эффективность гидролитической атаки (избыточная денатурация способствует агрегации и затрудняет гидролиз). Отношение белок:фермент должно быть достаточно высоким, чтобы фермент реагировал со скоростью, приближающейся к V_{max}, и происходил минимальный самогидролиз фермента; на активность фермента может негативно влиять его ингибирование накапливаемыми пептидами. Концентрация белка при периодических технологиях зачастую составляет 8–10% (если нет ограничений по растворимости), а концентрация добавленного фермента — 2% и зависит от его чистоты. Контроль скорости реакции осуществляют одним из методов, рассматривавшихся в главе 5. Реакцию прекращают после достижения требуемой степени гидролиза. Для обеспечения и физической функциональности необходимо обеспечить степень гидролиза 3–6% (средний размер пептида — 2–5 кДа), а для получения продуктов, используемых для питания спортсменов и больных — более 8% (для оптимальной растворимости необходим средний размер пептида 1–2 кДа). Для получения небольших пептидов и аминокислот, входящих в состав гипоаллергенных продуктов и детского питания, а также ингредиентов супов, подливок, соусов, требуется более высокая степень гидролиза (50–70%, средний размер пептида — менее 1 кДа). Чем выше степень гидролиза, тем больше вероятность образования небольших гидрофобных пептидов, обладающих горьким вкусом (меры, предотвращающие их накопление, мы рассмотрим далее). Относительно недавно появились сообщения о получении из белковых гидролизатов биоактивных пептидов, в том числе Ca^{2+}-связывающих фосфопептидов из казеина, повышающих усвояемость кальция, антиокислительных композиций и пептидов, пептидов, ингибирующих ангиотензин-расщепляющий фермент в плазме крови человека (потенциальный препарат, понижающий артериальное давление). Протеазы можно также использовать для отделения остаточного мышечного белка с костей рыб и наземных животных — инкубацию проводят при температуре 55–65 °C в течение 3–4 ч. Для получения продукта, наилучшим образом подходящего для той или иной области применения, смесь продуктов гидролиза белков можно подвергнуть очистке и/или разделению.

6.3.3.5.2. Свертывание молока

Добавление химозина телят (сычужного фермента, «реннина») и его производных приводит к свертыванию молока, что используется в производстве сыра [3, 141]. Его свертывающая активность обусловлена специфическим гидролизом связи PHE_{105}–MET_{106} в каппа-казеине, в результате которого выделяется гликомакропептид (ферментативная стадия), а на мицеллах формируется гидрофобная поверхность, способствующая агрегации (неферментативная стадия). Уникальную селективность химозина мы рассматривали выше (см. табл. 6.4). Стартовые культуры добавляют к молоку при температуре 40–45 °C, значение pH при этом снижается до 5,8–6,5, после чего для свертывания молока вносят химозин. По завершении последующих стадий производства сыра ферментативная активность частично сохраняется, что влияет на созревание сыра и его вкус. На протеолиз и формирование вкуса при созревании сыра влияют также протеазы стартовых культур. Первым ферментом, полученным методами генной инженерии и разрешенным к применению в пищевых продуктах, был рекомбинантный химозин из *E. coli* K-12, который достаточно широко используется и в настоящее время. К аналогам химозина относятся бычий и свиной пепсины, а также аспартатные эндопептидазы из *Rhizomucor spp.* и *Cryphonectria parasitica* — отношение их свертывающей способности к протеолитической активности уменьшается в указанном порядке, что приводит к снижению выхода продукта и появлению горького привкуса.

6.3.3.5.3. Тендеризация мяса

Для тендеризации мяса используют папаин и другие сульфгидрильные эндопептидазы (бромелаин и фицин) [3, 127]. Эффективность использования этих ферментов для тендеризации обусловлена их способностью гидролизовать коллаген и эластин — белки соединительной ткани, присутствие которых обусловливает жесткость мяса. Применение экзогенных эндопептидаз, однако, не лишено недостатков. Так, возможна их «передозировка»; кроме того, обусловленная ими тендеризация отличается от «естественного» созревания мяса из-за различий в избирательности протеолитической активности ферментов. Фермент, обычно папаин, в порошкообразной форме наносят или непосредственно на поверхность мяса в виде порошка (в качестве носителя используется соль или другой безвредный носитель), или вносят в виде солевого раствора путем инжектирования (можно также погружать мясо в этот солевой раствор).

Чистый солевой раствор фермента вводят внутривенно за 2–10 мин до убоя, иногда после оглушения, что способствует распределению фермента по мышечной ткани. Более комфортны для животных инъекции инактивированного папаина (его дисульфидной формы) — активируется такой фермент уже после убоя. Благодаря относительно высокой термостабильности рассматриваемых эндопептидаз более эффективная тендеризация зачастую достигается при кулинарной обработке мяса, а не при его хранении в условиях охлаждения.

6.3.3.5.4. Производство напитков

Вследствие ассоциации таннинов и белков возникает дефект пива — так называемая холодная муть. Для гидролиза белков и, следовательно, снижения образования мути уже давольно давно (с 1911 г.) используются папаин, но могут применяться и бромелаин, фицин и другие протеазы бактерий и грибов. Вносят эндопептидазы после сбраживания перед заключительным фильтрованием. При пастеризации папаин разрушается (его избыточное действие может понизить стабильность пены) [142]. Для улучшения образования растворимых азотных соединений из белков в сусло добавляют другие протеазы, в частности, нейтральную протеазу из *B. amyloliquefaciens*, что способствует последующему сбраживанию и снижает образование мути. Контроль протеолиза при производстве пива весьма важен, так как для получения продукта требуемого качества необходимо наличие определенного количества остаточного белка [77, 127].

6.3.3.5.5. Кондиционирование теста

Сила и реологические свойства теста, а также качество получаемого изделия зависят от состава теста и различных видов хлебопекарной муки. Тесто обычно характеризуется pH около 6,0, однако в некоторых случаях значение pH может достигать 8,0. Оптимум pH бактериальных *(Bacillus spp.)* протеаз находится в области щелочных значений, а для ферментов грибов *(Aspergillus spp.)* он сдвинут в область кислых значений. Протеазы применяют для изменения и оптимизации силы теста, необходимой в приготовлении того или иного изделия. Внесение протеаз сокращает продолжительность замеса, необходимой для получения требуемой эластичности, а также улучшает технологические свойства муки с пониженным содержанием клейковины (глютеном), делающей тесто менее эластичным и более жестким. Внесение экзогенных протеаз вызывают контролируемый гидролиз глютена на стадии кондиционирования теста и при хлебопечении до тех пор, пока они термически не дезактивируются. Гидролиз глютена ослабляет глютеновую сетку, что повышает пышность и эластичность теста, увеличивает объем и мягкость хлеба, а также однородность мякиша. Для контролируемого гидролиза используют протеазы со средней селективностью по отношению к пептидным связям (полный гидролиз нежелателен) [3, 77, 142]. Дозируют протеазы со скоростью, необходимой для обеспечения требуемой степени гидролиза до их дезактивации при выпечке. Избыточный протеолиз уменьшает объем изделия и обусловливает дефекты текстуры. Для слабой муки, использующейся в приготовлении коржей для пиццы, вафель и печенья более предпочтительны менее специфичные протеазы (или смесь протеаз). Выбор протеаз очень важен, поскольку они обладают разной специфичностью к основным белкам клейковины — глиадину и глютенину (табл. 6.7) [127]. Эти особенности экзогенных протеаз являются причиной разных технологических свойств получаемого теста.

6.3.3.5.6. Усиление вкуса (устранение горького привкуса)

Белковые гидролизаты и ферментированные пищевые продукты, подвергшиеся неполному протеолизу в присутствии эндопротеаз (сыр, какао-бобы, пиво, колбасные изделия, рыбный и соевый соусы) вследствие присутствия небольших гидрофобных пептидов в количествах выше порога обнаружения могут иметь горький привкус [97]. Для устранения этого привкуса используют экзопептидазы бактериального, грибного, растительного и животного происхождения (в классификации *IUBMB* — Международного союза биохимиков и молекулярных биологов — приводится более 70 таких ферментов). Экзопептидазы могут быть специфичными по отношению к С-терминальному (карбоксипептидазы) или N-терминальному (аминопептидазы) концам, или избирательно освобождать из субстрата какую-либо аминокислоту, ди- или трипептид. Помимо этих типов специфичности может проявляться и селективность к некоторым другим аминокислотным остаткам в субстратных сайтах P_1/P'_1 или P_2/P'_2 (примерами ферментов с такими свойствами являются *X-PRO*-дипептидиламинопептидаза и *LEU*-аминопептидаза). Для более эффектив-

Таблица 6.7
Гидролитическая селективность протеаз к основным белкам глютена. По [127]

Протеазный препарат	Относительная активность к		Относительная активность (глютенин : глиадин)
	глютенину	глиадину	
A	1,00	2,17	0,46
B	0,50	0,17	3,0
C	0,69	0,064	11
D	1,30	0,90	1,4
E	0,37	0,19	2,0
F	0,55	0,87	0,63
H	2,07	3,02	0,68
I	2,68	0,38	7,0
G	0,60	0,038	16

Замечание: Состав протеазного препарата в источнике не указан.

ного разложения горьких пептидов зачастую помимо экзопептидаз требуется присутствие специфичных эндо-пептидаз. Наиболее хорошо изучены экзо-пептидазы из молочнокислых бактерий, что дало возможность целенаправленно использовать для регулирования горького привкуса ферментированных или протеолизованных пищевых продуктов заквасочные или стартовые культуры, а также очищенные (бесклеточные) экстракты. Примером может служить промышленный штамм *Lactobacillus helveticus CNRZ*32, снижающий горечь и улучшающий вкус при созревании сыра, в котором содержится комплекс протеолитических ферментов, включающий эндопептидазы с пост-пролиновой специфичностью (*PRO* при S_1) и общую аминопептидазу [15]. Совместное действие этих ферментов приводит к разложению горьких пептидов до свободных аминокислот и, следовательно, к устранению горечи.

6.3.3.5.7. Синтез аспартама

Металлопротеаза термолизин используется в синтезе аспартама (*L–ASP–L–PHE*–OCH_3) — подсластителя, применяемого в основном в производстве низкокалорийных безалкогольных напитков [16, 58, 141]. Термолизин обладает оптимальными для этого свойствами: он стабилен при 90 °С и проявляет наибольшую активность при 80 °С; при высоких концентрациях соли (1–5 М) активность увеличивается более чем в 10 раз, что дает возможность использовать его в напитках с высокой осмомоляльностью (при высоких концентрациях субстрата). Он также стабилен в органических растворителях, селективно катализирует образование пептидной связи α-СООН-группой аспарагиновой кислоты (применение химического метода может привести к получению горького пептида, образованного β-СООН-группой *ASP*) и не гидролизует метиловый эфир фенилаланина (необходимый для получения сладкого вкуса). Синтез проводят в присутствии иммобилизованного термолизина в реакторе периодического действия в монофазной смеси этилацетата и воды; выход продукта при температуре 55 ° составляет более 95%.

6.3.3.6. Трансглютаминаза

Трансглютаминазы (ЕС 2.3.2.12, γ-глютамилпептид, амино-γ-глютамилтрансфераза) содержатся в животных и растительных тканях, а также в микроорганизмах (особенно *Steptoverticillium spp.*). У животных трансглютаминазы играют важную роль в сшивке фибрина (свертывание крови) и кератинизации (формирование эпидермической ткани), а также выполняют другие функции; в растениях эти ферменты, повидимому, участвуют образовании цитоскелета и клеточных стенок, а в бактериях — в сборке оболочки споровых клеток [35, 141]. Трансглютаминазы млекопитающих представляют собой типичные мономерные белки с молекулярной массой 75–90 кДа, тогда как микробные ферменты имеют молекулярную массу 28–30 кДа. Для их активации обычно необходим ион Ca^{2+}, а оптимальный диапазон значений pH находится в нейтральной и слабощелочной области. Как и эндопептидазы, трансглютаминазы более эффективно воздействуют на частично денатурированный или «развернутый» белок. Типы реакций, катализируемых трансглютаминазами, приведены ниже (символом ╟ обозначен белковый каркас):

Сшивка: $\|\text{GLN–CO–NH}_2 + \text{NH}_2\text{–LYS}\| \rightarrow \|\text{GLN–CO–NH–LYS}\| + \text{NH}_3$ (6.26)

Перенос ацила: $\|\text{GLN–CO–NH}_2 + \text{NH2–R} \rightarrow \|\text{GLN–CO–NH–R} + \text{NH}_3$ (6.27)

Деамидирование: $\|\text{GLN–CO–NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \|\text{GLN–COOH} + \text{NH}_3$ (6.26)

На этих реакциях основано применение трансглютаминаз в пищевой промышленности. Наиболее важной реакцией является сшивка белков изопептидной связью (уравнение 6.26), способствующая увеличению размера молекулы белка и образованию сетки внутри пищевого матрикса. Примером использования такой реакции является формирование необратимого и термостабильного геля с помощью поперечной сшивки яичных, молочных или соевых белков и желатина.

Добавление трансглютаминаз на начальных стадиях производства йогурта увеличивает силу геля и уменьшает синерезис, тогда как в производстве сыра это может привести к повышению выхода белка. Внесение трансглютаминаз в тесто при хлебопечении способствует образованию глютеновой (клейковинной) сетки, повышению стабильность теста, силы клейковины и вязкоупругих свойств теста, а также увеличению объема, улучшению структуры и качества мякиша. В производстве продуктов из мышечных тканей трансглютаминазы способствуют увеличению и контролю прочности геля продуктов из сурими (рыбного фарша). Кроме того, эти ферменты выполняют роль связующих при изготовлении мясных изделий из фарша, приготовленного из малоценных остатков разделки мяса, а также повышают прочность белкового геля в ветчинах и других колбасных изделиях.

6.3.4. Ферменты, преобразующие липиды

6.3.4.1. Липаза

Липазы (ЕС 3.1.1.3; триацилглицеринацилгидролазы) отличаются от других карбоксилэстераз тем, что они действуют только на границе раздела жировой и водной фаз. Необходимость этого легко заметить при анализе зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 6.25) [107]. Если реакция эстераз с растворимыми субстратами описывается уравнением Михаэлиса–Ментен, то липазы не взаимодействуют с субстратом до тех пор, пока его концентрация не превысит их растворимость, и на поверхности раздела фаз не начнется образование коллоидных агрегатов типа мицелл. Липазы и карбоксилэстеразы обладают почти одинаковой каталитической триадой *GLU(ASP)–SER–HIS в качестве трасформирующего локуса* (ранее мы отмечали это на примере сериновых протеаз, см. рис. 6.4). Следовательно, механизм действия этих двух групп ферментов аналогичен.

Хотя активность эндогенных липаз зачастую ассоциируется с гидролизом ацилглицеринов и проблемами, связанными с деградацией липидов и/или их гидролитическим прогорканием (или приводящем к окислительному прогорканию, так как освобождающиеся жирные кислоты более подвержены окислению), применение экзогенных липаз дает положительные эффекты. В настоящее время их используют для выделения из липидов ароматических (низкомолекулярных) жирных кислот и перегруппировки ацильных групп в глицериновом каркасе для получения из менее ценных липидов более ценные триацилглицерины. Выбор вида липаз определяется их селективностью, требуемой для получения соответствующих продуктов.

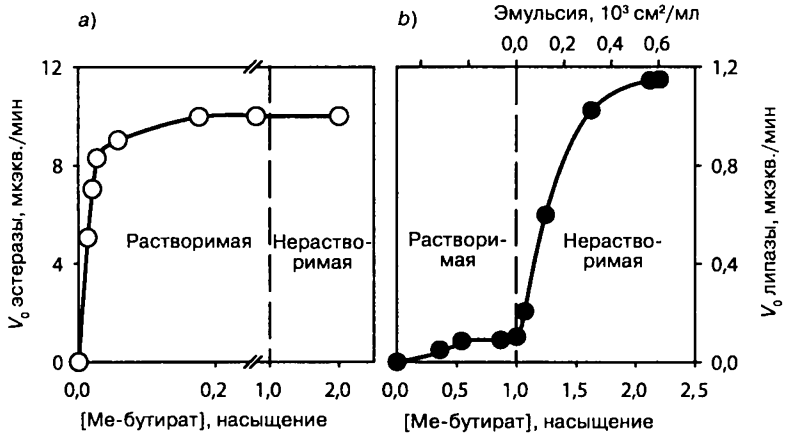


Рис. 6.25. Дифференциация эстеразы (*a*) и липазы (*b*) по свойствам субстрата. По [107]

Данные по селективности липаз были приведены выше (см. рис. 6.16).

Различают селективность по отношению к ацильной группе жирной кислоты, к положению эфира в *sn*-глицериновом каркасе, к типу глицерида (моно-, ди- или триглицериду), а также к взаимодействию между этими факторами, определяющему характерную стереоселективность. Типы селективности промышленно выпускаемых или перспективных липаз из более ста охарактеризованных источников приведены в табл. 6.8 [2, 51, 69, 89, 92, 94, 99, 123, 146]. Особенно редким типом селективности относительно *sn*-2-глицериновых сайтов обладает липаза из *Candida antarctica A* и минорная изоформа липазы из *Geotricum candidum,* хотя это свойство может быть связано с типом субстратов (ацильных групп липидов), использованных при изучении селективности. Была также проанализирована стереоселективность многих липаз из табл. 6.8 (см. рис. 6.16, *d*). Для липаз обычно характерен оптимальный диапазон значений pH 5,0–7,0 и температур 30–60 °C.

Таблица 6.8

Селективность некоторых промышленно применяемых и перспективных липаз. По [2, 51, 69, 89, 92, 94, 99, 123, 146]

Липаза	Селективность относительно:			Другие особенности
	sn-глицериновых позиций	жирных кислот [a]	глицеролипида [b]	
1. *Aspergillzs niger*	*sn*-1,3 >> *sn*-2	Короткоцепочечных, 16	*AG*	
2. *Candida antarctica,* формы A и B	A: *sn*-2 > *sn*-1,3	Короткоцепочечных, 18:X	*AG*	
	B: *sn*-1,3 > *sn*-2	6–10 > широкая	*AG;GL*	Связывающий жирные кислоты «карман» — ~13C
3. *Candida rugosa*	*sn*-1,3 > *sn*-2; неспецифичны	4, 8 > широкая	*AG*	Многочисленные изоформы (ранее *C. cylindraceate*), связывающий жирные кислоты «карман» — ~17C
4. *Carica papaya*	*sn*-1,3 > *sn*-2	4, Короткоцепочечных	*AG*	В соке содержится папаин
5. *Geotricum candidum*	Неспецифичны; *sn*-2 > *sn*-1,3	8, Длинноцепочечных 18:X	*AG*	Многочисленные изоформы (минорная изоформа *sn*-2-селективна)
6. Пататин (из картофеля)	*sn*-1,3 > *sn*-2	8, 10	*MAG* > *DAG*; *GL, PL*	Общая липидная ацилгидролаза
7. *Penicillium spp.*	Неспецифичны; *sn*-1,3 > *sn*-2	Длинноцепочечных	*MAG, DAG*	Многочисленные изоформы
8. Поджелудочная	*sn*-1,3 (строго специфичны)	4 > широкая	*AG*	Связывающий жирные кислоты «карман» — ~8C
9. *Pseudomonas spp.*	Неспецифичны; *sn*-1,3 > *sn*-2	8, 16	*AG*	Аналогичный *Burkholderia spp.* связывающий жирные кислоты «карман» — ~14C
10. *Rhizomucor miehei*	*sn*-1,3 >> *sn*-2	8–18	*AG*; *PL, GL*	Связывающий жирные кислоты «карман» — ~18C
11. *Rhizopus arrhizus*	*sn*-1,3 >> *sn*-2	8–14	*AG*; *GL, PL*	Почти идентичны липазам из *Rhizopus spp.*

[a] В обозначении жирных кислот указано число атомов углерода в *n*-ацильной цепи; например, 18:*X* означает C_{18}-жирную кислоту с *X* = 0–3 двойными связями.

[b] *AG* — ацилглицерины; *GL* — гликолипид; *PL* — фосфолипид; *MAG* — моноацилглицерин; *DAG* —диацилглицерид. Поскольку данные по селективности были получены при исследовании разных реакций в различных условиях, многие данные весьма противоречивы и неоднозначны.

6.3.4.2. Применение липаз

6.3.4.2.1. Формирование вкуса и аромата

Липазы, использующиеся для формирования пикантного вкуса и аромата созревших сыров, особенно итальянских и сортов с плесенью, селективно выделяют из триацилглицеринов молочного жира корот-

коцепочечные (С4–С8) жирные кислоты. К ним относятся прегастральные липазы коз, ягнят и телят [3,48,142]. Так как эти короткоцепочечные жирные кислоты в основном находятся в положении *sn*-3, селективные к этой позиции липазы могли бы, в принципе, применяться в производстве сыров. К таким ферментам относится и липаза из сока папайи, однако поскольку в этом соке содержится папаин, для сыра он не подходит. Известно также, что некоторые микробные липазы (из *C. rugosa, R. miehei* и *A. niger*) выделяют из молочного жира короткоцепочечные и/или *sn*-1,3-связанные жирные кислоты (см. табл. 6.8). Большинство липаз при гидролизе дают ненасыщеные жирные кислоты, при окислении которых образуются кетоны и лактоны; некоторые из них возникают в результате метаболизма микроорганизмов. Липазы используются также для получения ферментно-модифицированного сыра, применяющегося для получения как плавленых сыров, так и спредов, соусов и вкусоароматических добавок (остаточная активность фермента при пастеризации изчезает). При передозировке фермента получается продукт с мыльным или слишком едким вкусом и запахом.

6.3.4.2.2. Перестройка ацилглицеринов

Важным процессом с участием липаз является направленное перераспределение ацильных групп липидов, позволяющее получать липиды с заданной структурой [51]. Этот процесс проводится в «микроводной» среде, то есть в органическом растворителе или в среде самого липидного субстрата, выполняющего роль «растворителя» (содержание воды в этой среде не превышает 1%). В этих условиях липазы катализируют не гидролиз эфиров, а их (ре)синтез. На рис. 6.26 приведены различные типы перестройки ацилглицеринов: перестройка внутри одного триацилглицерина (интраэтерификация, путь *D*); взаимодействие триацилглицерина с экзогенной жирной кислотой (ацидолиз, путь *A*); с жирным(и) ацилэфиром(ами) (переэтерификация, путь *B*) или спиртом(ами) (алкоголиз, путь *C*); а также между жирной кислотой и спиртом (косубстратами) (этерификация, путь *E*). В применяющихся на практике процессах целенаправленно используется селективность липаз с учетом распределения жирных кислот в исходном материале (природный источник триацилглицерида). Примеры таких процессов мы рассмотрим в следующем подразделе.

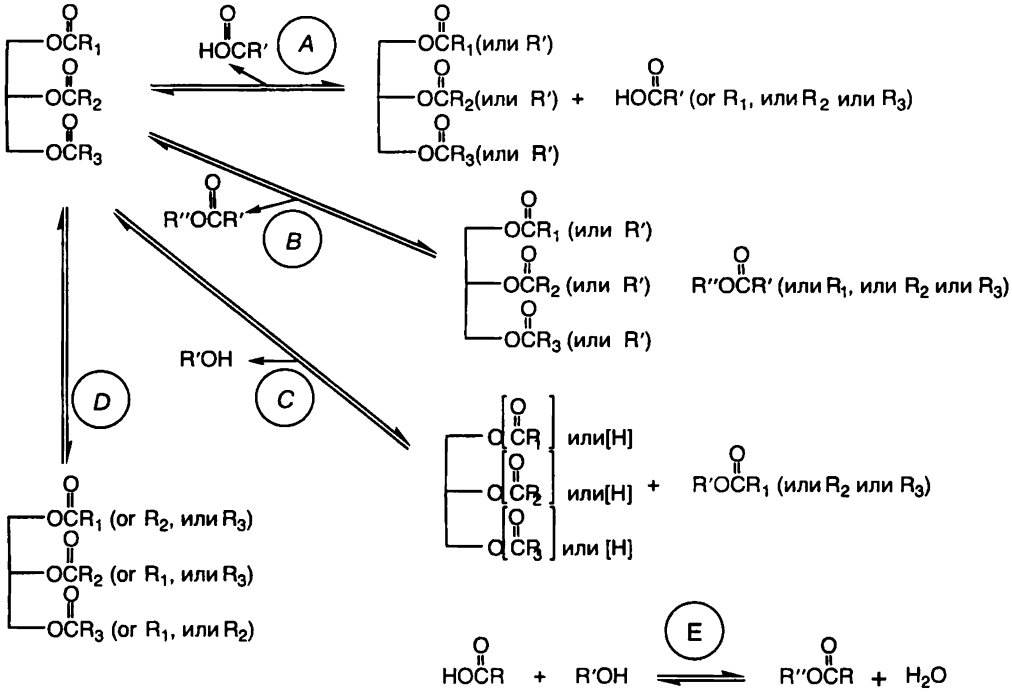


Рис. 6.26. Типы реакций перестройки ацилглицеринов, протекающих под действием липаз в микроводной среде: *A* — ацидолиз; *B* — переэтерификация; *C* — алкоголиз; *D* — интраэтерификация; *E* — этерификация

Масло какао относится к жирам премиум-класса благодаря своей природной «чистоте» — более 80–90% от общего количества триацилглицеринов составляют *POSt* (38–44%), *StOSt* (28–31%) и *POP** (15–18%), что определяет узкий диапазон температур плавления масла какао ([51], см. главу 4). Заменители какаомасла можно получить с использованием реакции «ацидолиза» (см. рис. 6.26) средней фракции пальмового масла (58% *POSt*) и экзогенной стеариновой кислоты под действием *sn*-1,3-региоселективной липазы. Реакцию проводят при перемешивании при температуре 40 °С в течение 16 ч, получая в результате продукт, содержащий 32% *POSt*, 13% *StOSt* и 19% *POP*. В этой технологии используют липазы из *Aspergillus, Rhizomucor* или *Rhizopus*, которые для более быстрой переработки сырья могут быть иммобилизованы в ферментере на слое носителя. Относительно недавно был разработан препарат «*Betapol*», представляющий собой жировой продукт, обогащенный *POP*-триацилглицерином (основным триацилглицеридом грудного молока) [111]. В связи с этим *POP* позволяет выпускать продукты для питания детей раннего возраста. Удобным сырьем для его получения является трипальмитин (*PPP*, обогащенный пальмитином стеарин), который может взаимодействовать с олеиновой кислотой (1 1 по массе, реакция ацидолиза, см. рис. 6.26, *а*, под действием *sn*-1,3-селективной липазы). Двухстадийный процесс с участием этой липазы включает стадию алкоголиза *PPP* с этанолом (рис. 6.26, *с*) с образованием *sn*-2-пальмитоилглицерина, после которой проходит реакция этерификации (рис. 6.26, *е*) в присутствии олеиновой кислоты. Препарат «*Betapol*» может быть получен также из природного сырья — богатой трипальмитином фракции пальмового масла и высокоолеиновых подсолнечного масла или масла канолы. Аналогичные подходы могут быть реализованы при получении с помощью липаз других «структурированных липидов» (например, медицинского или диетического назначения), но последние еще не получили широкого распространения.

6.3.4.2.3. Улучшение свойств теста

Липазы являются важными ингредиентами теста для хлебопечения [3, 127, 142]. Они дополняют эндогенные липазы злаковых культур и вносятся в качестве улучшителей для увеличения объема изделий, повышения однородности мякиша и размера пор в нем, а также для предотвращения черствения без ухудшения реологических свойств теста. Эти положительные эффекты обусловлены возникновением при гидролизе липидов (муки или добавленных) моно- и диацилглицеринов, обладающих эмульгирующими свойствами и стабилизирующих мелкие поры в тесте. Моноацилглицерины могут также образовывать комплексы включения с амилозой, что замедляет ретроградацию крахмала (черствение) после выпечки. Использование липаз вместо синтетических эмульгаторов повышает привлекательность продукта для потребителя. Источниками используемых в хлебопечении липаз являются *Rhizomucor* и *Rhizopus spp.* [48]; эти липазы помимо ацилглицеринов гидролизуют также гликолипиды и фосфолипиды (см. табл. 6.8). Лизофосфолипиды и лизогликолипиды обладают ярко выраженными поверхностно-активными свойствами. Липазы применяют для выпуска макаронных изделий, улучшая их белизну, что очень важно для потребителя [142]. Этот эффект достигается благодаря окислению выделяющихся ненасыщенных жирных кислот и обесцвечиванию теста за счет вторичных реакций. Внесение липаз снижает ломкость сухих макарон и их слипание при варке, что объясняется уменьшением потерь крахмала (вероятно, вследствие образования его комплексов с жирными кислотами и лизоглицеролипидами).

6.3.4.3. Липоксигеназы

Чаще всего липоксигеназы оказывают негативное влияние на пищевые продукты и качество жиров (см. далее). К положительным свойствам липоксигеназ можно отнести их окисляющее воздействие при кондиционировании теста [142]. Они окисляют ненасыщенные жирные кислоты, образовавшиеся при гидролизе липидов под действием липаз, что приводит к упрочнению клейковинной (глютеновой) сетки за счет дисульфидных сшивок внутри глютена и повышению вязкости и эластичности теста. Наиболее предпочтительным способом внесения липоксигеназ в тесто является добавление соевой или бобовой муки, что позволяет свести к минимуму внесение в тесто других окислителей (например, броматов). Вторичные реакции окисления могут также разлагать эндогенные каротиноиды и обесцвечивать или отбеливать готовые изделия, что весьма желательно для макаронных и некоторых сортов хлебобулочных изделий.

* Использованы сокращенные обозначения стеариновой (*St*), пальмитиновой (*P*) и олеиновой (*O*) жирных кислот (см. главу 4). Положение кислот указано в следующем порядке *sn*-1, *sn*-2, и *sn*-3. — *Примеч. авт.*

6.3.4.4. Фосфолипазы

Известно несколько типов фосфолипаз (A_1, A_2, *C* и *D*), каждый из которых селективен по отношению к строго определенным и при этом различным связям в фосфолипидах (рис. 6.27). В промышленности фосфолипазу A_2 (ЕС 3.1.1.4) из *Aspergillus spp.* и панкреатических источников вносят в неочищенное растительное масло на стадии удаления олеосмол в целях гидролиза фосфолипидов в положении *sn*-2 и получения соответствующего лизофосфолипида [48], что необходимо для удаления негидратируемых фосфолипидов. Фосфолипаза A_2 может найти применение и при получении эффективных лизофосфолипидных эмульгаторов из богатого фосфолипидами сырья, например, из яичного желтка [3] (этот процесс может проходить *in situ* при производстве хлеба при добавлении липазы, обладающей активностью, характерной для фосфолипазы A_2, см. табл. 6.8).

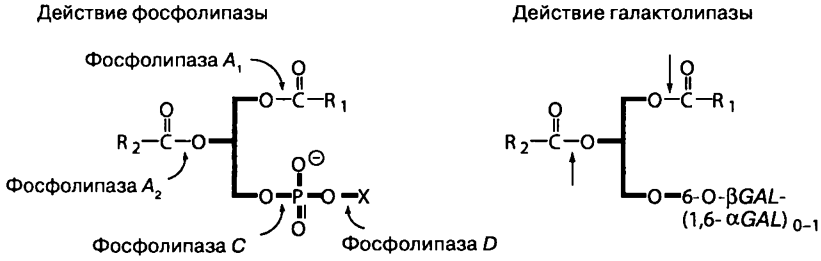


Рис. 6.27. Специфичность по связи липолитических ферментов, действующих на полярные глицеролипиды

6.3.5. Прочие области применения ферментов

Известно, что в присутствии кислой уреазы (ЕС 3.5.1.5, мочевиноаминогидролазы) из *Lactobacillus fermentum* в вине не накапливается мочевина, которая при взаимодействии с этанолом может образовывать этилкарбамат, обладающий канцерогенными свойствами. Добавление гексозооксидазы (ЕС 1.1.3.5) к тесту для хлебопечения, содержащему способные к окислению гексозы, действует как улучшитель теста [3]. Каталазу (ЕС 1.11.1.6, H_2O_2 : H_2O_2-оксидоредуктазу) специально добавляют для удаления остаточного пероксида водорода из молока, подвергнутого антимикробной обработке и по каким-либо причинам не охлажденного [48]. Сульфгидрильную оксидазу (ранее ЕС 1.8.3 без названия, а в настоящее время ее называют тиолоксидазой, ЕС 1.8.3.2, тиол O_2-оксидоредуктазой) долгое время применяли для устранения дефекта вкуса молока после высокотемпературной обработки, обусловленного образующимися тиолами [141]. Предлагается также применять в качестве улучшителя муки сульфгидрильную (тиоло-) оксидазу из *A. niger*, обладающую окислительными свойствами и формирующую в клейковине дисульфидные связи [3].

Развитие биотехнологии и генетики способствует снижению стоимости ферментов, повышению конкурентоспособности ферментативных технологий и расширению областей практического использования ферментов. В рамках этой книги нет возможности описать все возможные области применения ферментных технологий, но приоритетными задачами являются расширение температурной и pH-стабильности ферментов, а также извлечение ценных компонентов из отходов сельхозпродукции.

6.4. Влияние внешних факторов на активность ферментов

Наиболее важными внешними факторами, влияющими на активность ферментов, являются температура, а также значения pH и активности воды. Изменяя эти параметры, можно контролировать действие ферментов в пищевом матриксе. Далее мы покажем, как можно осуществлять такой контроль.

6.4.1. Температура

6.4.1.1. Влияние температуры на активность ферментов

Температура оказывает на активность ферментов предсказуемое и разнонаправленное (активация и дезактивация) действие. При повышении температуры возрастает свободная энергия системы; в результате чего снижается энергетический барьер реакций и возрастает их скорость. Заменив в уравнении (6.1) (см. раздел 6.2.3.1) произведение *PZ* на аррениусовский частотный коэффициент *A* и логарифмируя, получим:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}. \qquad (6.29)$$

Из этого уравнения (6.29) вытекает линейная зависимость между ln k и $1/T$, тангенс угла наклона которой равен $-E_a/R$. Чем больше E_a, тем сильнее температура влияет на скорость реакции.

Отметим, что уравнение (6.29) применимо для расчета и прогнозирования констант скорости (k_x), а также параметров, связанных или прямо пропорциональных константам скорости ($k_{кат}$, V_{max}, K_M, V_{max}/K_M, K_s и др.), если при изменении температуры порядок реакции не меняется. Простое измерение активности фермента при определенных условиях не дает возможность проверить, выполняется ли это требование. Наличие точек перелома на аррениусовской линейной зависимости (с отрицательным наклоном) или ее нелинейность свидетельствуют о сложном характере биохимических процессов, например, о наличии липидного фазового переноса для мембранных ферментов или о присутствии нескольких изоформ ферментов. Такие переломы свидетельствуют о температурно-зависимом изменении K_M, об изменении порядка реакции, скоростьлимитирующей стадии или об ионизации основного блока [52, 115].

Значение аррениусовской зависимости состоит в том, что она дает возможность определить E_a, являющуюся индикатором эффективности катализа ферментативной реакции относительно некаталитической или химически катализируемой реакции (см. табл. 6.1). При повышении температуры на аррениусовских зависимостях, описывающих кинетику ферментативных реакций, наблюдаются отклонения от линейности (но не «излом») (при ~0,0030 K^{-1} на оси x рисунка 6.28, *a*) [6, 67]. Причиной этого является вторичный температурный эффект, вызывающий денатурацию. При температуре выше максимума или оптимума активности фермента наблюдается резкое падение константы скорости реакции. По положительному наклону температурной зависимости скорости реакции можно определить E_a процесса дезактивации фермента (в приведенном примере — 102 ккал/моль). Значения E_a дезактивации и активации ферментов обычно лежат соответственно в пределах 40–200 и 6–15 ккал/моль. Денатурация фермента включает развертывание больших сегментов полипептидной цепи (глобул), а также процесс, требующий большей свободной энергии, чем это необходимо для стабилизации переходного состояния в активном центре.

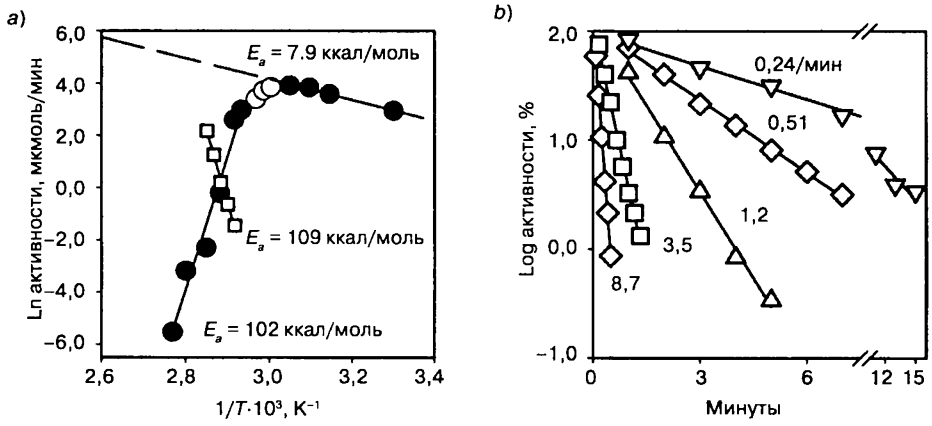


Рис. 6.28. Термочувствительность пектинметилэстеразы томатов: *a* — аррениусовская зависимость, по [67]; оригинальные данные показаны кружками, причем при линейной аппроксимации использовались черные кружки; зависимость, показанная белыми квадратиками, построена по данным рис. *b*; *b* — зависимости первого порядка, описывающие процесс дезактивации, по [6]; их увеличивающийся наклон соответствует следующим температурам инкубации: °С: 69,8, 71,8, 73,8, 75,8 и 77,8

Точно определить значения $v0$ (линейной скорости реакции) при температурах, соответствующих резкому снижению активности фермента (см. рис. 6.28, *a*) довольно трудно. Более удобный способ определения параметров термической инактивации фермента заключается в следующем: после инкубации фермента при различных температурах определяют его остаточную активность при стандартизованных условиях (обычно при оптимальном pH и недезактивирующей температуре, рис. 6.28, *b*) через различные временные интервалы. При этом должно выполняться условие [S] >> K_M*,чтобы скорости не лимитиро-

* Иногда ограниченная растворимость S или другие осложняющие факторы делают это условие трудновыполнимым. — *Примеч. авт.*

вались субстратом, были приблизительно равны V_{max} ($\propto E_T$) и линейно зависели от $[E]$. Поскольку дезактивация фермента часто является реакцией первого порядка, можно записать (в уравнении 6.30 $[E_0]$ — начальная концентрация фермента):

$$[E]=[E_0]e^{-k_d t} \text{ и } \ln\frac{[E]}{[E_0]}=-k_d t. \tag{6.30}$$

Результаты интерпретируются как полулогарифмические зависимости для каждой температуры. Значения k_d (константы скорости дезактивации) можно определить по тангенсу угла наклона линейных зависимостей, равном $-k_d/2{,}303$ (см. рис. 6.28, *b*). По значениям k_d строят аррениусовскую кривую (см. рис. 6.28, *a*) и определяют энергию активации/инактивации фермента (в рассматриваемом примере — E_a = 109 ккал/моль). Таким образом, близкие значения энергии активации процесса инактивации пектинметилэстеразы плодов томатов были получены двумя независимыми методами.

6.4.1.2. Оптимум температуры для функционирования фермента

Оптимум температуры для активности фермента определяется активирующим и дезактивирующим действием температуры. Хотя температурный оптимум соответствует максимальной скорости ферментативной реакции ($v0$), это состояние продолжается недолго — прогрессирует денатурация, и исходная активность фермента теряется. Пример такого поведения фермента (пуллуланазы из *Aerobacter aerogenes*) представлен на рис. 6.29, *a* [48, 129]. Отметим плавный рост активности фермента при 10–40 °С, резкое возрастание константы скорости дезактивации (k_d) при 50–60 °С и значительное снижение активности и стабильности фермента при 50–60 °С. О более выраженной зависимости дезактивации фермента от температуры по сравнению с его активацией свидетельствуют также данные рисунка 6.28, *a*.

Таким образом, при увеличении температуры доминирующим действием температуры становится дезактивация. Зависимость активности и стабильности некоторых используемых в пищевой промышленности ферментов от температуры приведена на рис. 6.29, *b*. Верхняя граница используемых на практике температур обычно на 5–20 °С ниже температуры, соответствующей максимальной скорости реакции, что позволяет сохранить активность фермента в течение всего технологического процесса.

Аналогичный представленному на рис. 6.28, *a* график используется для определения влияния температуры на равновесные процессы, но в этом случае по оси ординат откладывают значения lg K, а тангенс угла наклона равен $\Delta H°$, а не E_a.

$$\frac{d\ln K}{d(1/T)}=\frac{-H°}{R}. \tag{6.31}$$

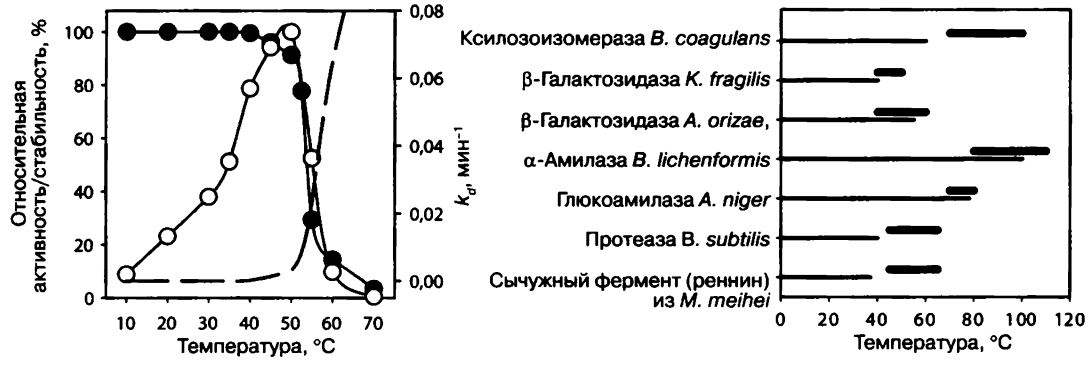


Рис. 6.29. Термочувствительность пуллуланазы (*a*) и некоторых других промышленных ферментов (*b*). По [48, 129]. Темными кружками показана стабильность фермента, светлыми — активность фермента; пунктиром на рис. *a* обозначена зависимость скорости дезактивации фермента от температуры. На рис. *b* жирными линиями показан оптимальный температурный интервал для фермента; правые концы тонких линий соответствуют температуре, при которой данный фермент применяется в промышленности

Температурная зависимость константы равновесия (K_{eq}) реакции изомеризации глюкозы и фруктозы, катализируемой ксилозоизомеразой, приведена на рис. 6.30 [98]. Эта зависимость используются также при анализе влияния температуры на другие характеристики равновесных состояний, определяющие оптимальное функционирование ферментов — $K^{\ddagger}$ (из теории переходного состояния), K_a (константу ионизации аминокислот в боковой цепи), кинетические функции, вовлеченные в осуществление ферментативной активности, а также кинетические функции, которые представляют (псевдо-) равновесные состояния (K_M, K_S).

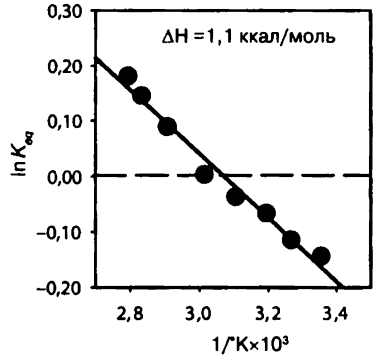


Рис. 6.30. Температурная зависимость константы равновесия реакции изомеризации, протекающей в присутствии ксилозоизомеразы. По [98]

Существуют температурные эффекты иной природы, чем рассмотренные выше. В случае олигомерных ферментов, ассоциация которых обусловлена неполярными взаимодействиями, может наблюдаться дезактивация при низких температурах (так называемая «холодовая дезактивация»). Низкие температуры ослабляют эти взаимодействия (см. главу 5) и способствуют диссоциации субъединиц и понижению активности. Повышенные температуры уменьшают растворимость газов в воде, так что скорость реакции с участием O_2 может лимитироваться его растворимостью. Для некоторых липидов при температурах, использующихся в производстве пищевых продуктов, характерны фазовые переходы. Присутствие твердой фазы, особенно в фосфолипидных бислоях, создает поверхностные дефекты и облегчает доступ липолитических ферментов и, следовательно, гидролиз.

6.4.1.3. Заключительные замечания

Хотя каждый фермент по-своему уникален, все-таки можно сформулировать некоторые общие положения относительно влияния температуры на стабильность ферментов. Лиганды (субстраты или даже ингибиторы) повышают их стабильность, сохраняя нативную структуру активного центра и участков вокруг него. Другие компоненты среды могут как увеличивать, так и уменьшать термостойкость ферментов. Некоторые общие тенденции заключаются в том, что термостабильность возрастает при уменьшении размера молекулы белка и числа полипептидных цепей, при увеличении количества дисульфидных связей и солевых мостиков, и наконец, стабильность нативных белков выше, чем *in vitro*. Отметим также, что термостойкость растворимых и внеклеточных белков выше, чем мембранных и внутриклеточных.

6.4.2. Влияние pH

6.4.2.1. Общие замечания

Для всех ионизирующихся групп белков характерны pH-зависимые переходы в соответствии со значениями pK_a аминокислотных остатков (табл. 6.9) [41, 113, 140]. Многие из этих переходов влияют на *стабильность* ферментов, и в узком диапазоне pH они могут оказывать влияние совместно, полностью дестабилизируя фермент (см. главу 5). С другой стороны, ионизация большинства аминокислот в боковой цепи практически не влияет или оказывает ограниченное влияние на *активность* фермента, и они остаются «прозрачными» для функционирования фермента. Существует лишь ограниченное число (зачастую от 1 до 5) аминокислотных остатков, ионизация которых определяет pH-зависимость активности фермента.

Таблица 6.9

Свойства ионизирующих групп аминокислот в ферментах. По [41, 113, 140]

Ионизирующаяся группа	pK_a, 25 °C	ΔH_{ion}, ккал/моль	Ионизирующаяся группа	pK_a, 25 °C	ΔH_{ion}, ккал/моль
Карбоксильная			Аммониевая		
С-терминальная (α)	3,0–3,2	~0± 1,5	N-Терминальная (α)	7,5–8,5	10–13
β/γ-карбоксильная (*ASP, GLU*)	3,0–5,0		ε-Аминная (*LYS*)	9,4–10,6	
Имидазольная (*HIS*)	5,5–7,0	6,9–7,5	Фенольная (*TYR*)	9,8–10,4	6,0–8,6
Сульфгидрильная (*CYS*)	8,0–8,5	6,5–7,0	Гуанидиновая (*ARG*)	11,6–12,6	12

Последняя зависит также от ионизации субстрата, продукта, ингибитора и кофакторов; значение pH может влиять и на $K_м$ (или на равновесное распределение реагентов в ферментативной реакции).

6.4.2.2. Стабильность ферментов как функция pH

Ферменты имеют характерную зависимость стабильности от значения pH. Пример такой зависимости для пуллуланазы из *A. aerogenes* приведен на рис. 6.31, *a* [48,129].

Следует отметить две общие тенденции:

диапазон значений pH, в котором фермент стабилен, обычно шире, чем диапазон его активности;

стабильность фермента при дестабилизирующих значениях pH снижается резко, поскольку pH-дестабилизация является кооперативным процессом. И наоборот, активность фермента при изменении pH снижается более плавно. Эта зависимость похожа на кривую титрования, поскольку определяется только наличием от одной до трех ионизирующихся групп.

Зависимость стабильности ферментов от pH определяют следующим образом. Фермент инкубируют при различных pH и определяют его остаточную активность в стандартизованных условиях (оптимальном или близком к оптимальному значении pH и температуре, при которой не происходит денатурации). Затем строят график, аналогичный получаемому при исследовании температурной зависимости (см. рис. 6.28, *b*), заменяя температуру на pH. Аналогично температурным эффектам влияние pH на стабильность ферментов зависит от состава среды и условий (например, субстрат и другие лиганды могут повышать стабильность). Так, в присутствии Ca^{2+} интервал pH, в котором α-амилаза имеет более чем 50%-ную активность, увеличивается от 4–7 до 4–11 [140]. В некоторых случаях pH-индуцированная потеря активности может быть обратимой, однако лишь в ограниченном интервале дестабилизирующих значений pH и в течение ограниченного времени. Пуллуланаза неактивна, но стабильна при pH 9–11, по крайней мере, в течение 30 мин, и за это время активность может быть полностью восстановлена при подкислении до pH 6–7 (рис. 6.31, *a*).

Для правильного выбора фермента, который должен быть стабилен в предлагаемых условиях достаточно долго, необходимо знать pH-стабильность ферментов. Важно также понимать, как дестабилизация фермента влияет на уменьшение активности при данном значении pH. В связи с этим зависимость активности фермента от pH следует правильно интепретировать (см. следующий раздел). Данные о стабильности некоторых промышленно выпускаемых ферментов при различных значениях pH приведены на рис. 6.31, *b*; интервалы стабильности, показанные на этом рисунке, соответствуют технологическим температурам, при которых стабильность ниже, чем в примере с пуллуланазой (данные для нее получены при «неденатурирующей» температуре 40 °C). Установлено, что при pH, далеких от оптимальных для данного фермента, термостойкость снижается. Таким образом, на стабильность фермента совместно влияют и температура, и значение pH.

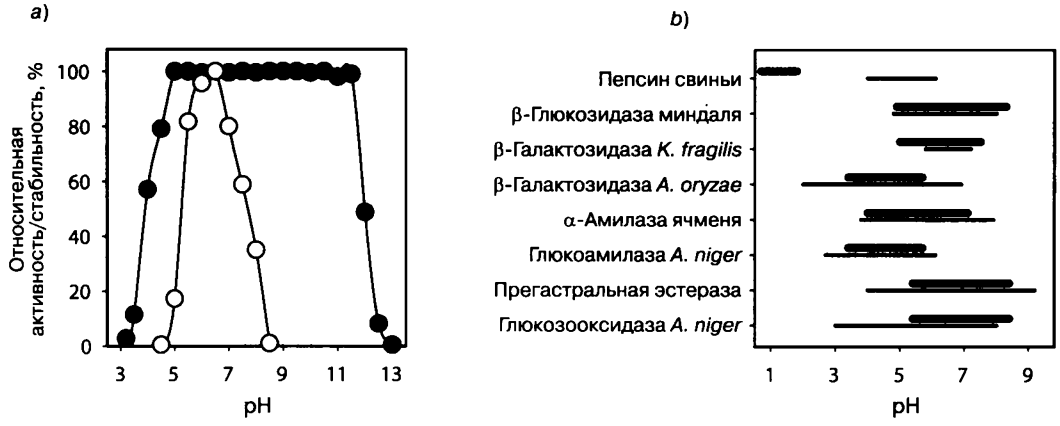


Рис. 6.31. Чувствительность к pH пуллуланазы (*a*) и некоторых промышленных ферментов (*b*). По [48, 129]. Черными кружками на рис. *a* показана стабильность фермента, а светлыми — его активность. На рис. *b* жирные линии соответствуют более чем 80%-ной активности, а нежирные — более чем 80%-ной стабильности фермента

6.4.2.3. Влияние pH на активность ферментов

Подобно тому, как каталитический центр фермента включает несколько важнейших аминокислот, так и отклик активности фермента на значение pH определяется несколькими ионизирующимися кислотами. Их роль заключается: 1) в поддержании конформационной стабильности активного центра; 2) в связывании субстрата; 3) в трансформации субстрата, то есть в участии в процессах, для которых важна степень ионизации [41, 113, 140]. Диапазон значений pH, обеспечивающий более чем 80% от максимальной активности ряда ферментов при технологических температурах, приведен на рис. 6.31, *b*.

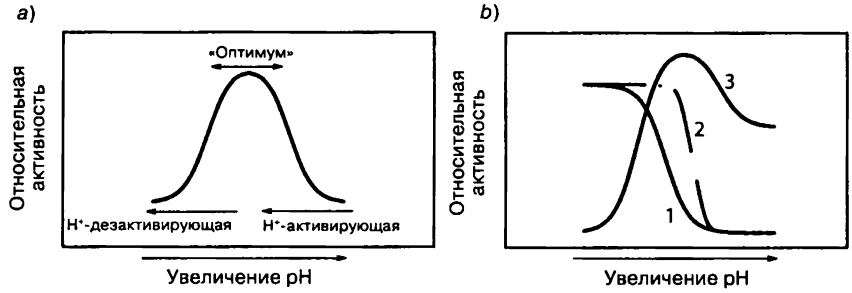


Рис. 6.32. Типичные pH-зависимости активности фермента: *a* — «колоколообразная» зависимость; *b* — другие виды pH-зависимостей

Чтобы понять, как влияет pH на активность ферментов, рассмотрим типичную колоколообразную pH-зависимость, часто наблюдающуюся для многих ферментов (рис. 6.32, *a*). Особенностью этой зависимости является наличие явных «щелочного» и «кислотного» переходов, которые можно назвать H^+-активирующей и H^+-дезактивирующей стадиями. Так, протонирование щелочной группы, pK_a которой лежит в щелочной области, способствует активности фермента, и наоборот, протонирование группы с «кислым» pK_a ее снижает. К другим типам pH-зависимостей (рис. 6.32, *b*) относится наличие одного pH-перехода (кривые *1* и *2*; кривая *2* соответствует более резкому падению активности фермента), а также pH-переход, приводящий к менее активному (кривая *3*) вместо неактивного состояния фермента (см. кривые *1* и *2*).

Эмпирическая оценка «оптимума активности» фермента при определенных условиях (например, как на рис. 6.31, *a*) достаточно произвольна и потому имеет ограниченное значение. Более важно выяснить, влияет ли значение pH на конформационную стабильность, связывание субстрата или его трансформацию. Так, анализ зависимости V_{max} и K_M от pH дает возможность понять, как активность фермента зависит от pH. Поведение основных ионизирующихся групп ферментов аналогично поведению других слабых кислот и оснований:

$$EH \rightleftarrows E^- + H^+ \text{ и } K_a = \frac{[H^+][E]}{[EH]}. \tag{6.32}$$

Такая ионизация происходит в обеих («свободной», *E*, и «связанной», *ES*) формах фермента и описывается константами равновесия в кислой (K_{a1}) и щелочной (K_{a2}) областях. Для свободного фермента это равновесие между тремя ионизированными состояниями данного фермента можно представить следующим образом:

$$HEH^+ \overset{K_{E1}}{\rightleftarrows} EH + H^+ \overset{K_{E2}}{\rightleftarrows} E^- + H^+ \tag{6.33}$$

где

$$K_{E1} = \frac{[H^+][HE]}{[HEH^+]} \text{ и } K_{E2} = \frac{[H^+][E^-]}{[EH]}. \tag{6.34}$$

Аналогично для комплекса *ES* запишем:

$$HEH^+S \xrightleftharpoons{K_{ES1}} EHS + H^+ \xrightleftharpoons{K_{ES2}} E\ S + H^+, \tag{6.35}$$

где

$$K_{ES1} = \frac{[H^+][EHS]}{[HEH^+S]} \text{ и } K_{ES2} = \frac{[H^+][E^-S]}{[EHS]}. \tag{6.36}$$

Все ионизационные и кинетические равновесия можно объединить так, как это было сделано при анализе каталитического действия ферментов (рис. 6.33) [28, 113, 140] В предлагаемой модели наиболее активными состояниями фермента являются формы *EH* и *EHS*, которые ассоциируются с оптимальными или «внутренне присущими» значениями V_{max} и K_M (см. рис. 6.32, *a*). Эта модель дает возможность определить, чем обусловлено уменьшение «активности» в кислой или щелочной среде — неспособностью ферментных форм (HEH^+ и E^-) связывать *S* или преобразовывать *S* в *P* (HEH^+S и *E–S*). Эта модель включает все формы фермента, существующие при данном pH (см. кривую 3 на рис. 6.32, *b*), и pH-зависимые кинетические константы α- и $\beta K_M^{H^+}$, α- и $\beta V_{max}^{H^+}$, где α и β изменяются в пределах соответственно $1 \rightarrow \infty$ и $1 \rightarrow 0$. Величины $K_M^{H^+}$ и $V_{max}^{H^+}$ показывают изменение этих кинетических констант при изменении pH относительно значений «внутренних» K_M и V_{max} при оптимальном значении pH.

Учитывая колоколообразную форму кривой pH-зависимости активности фермента, можно предположить, что в растворе существуют три формы с разной степенью ионизации, причем каждая из них способна связывать субстрат, но только одна оптимально ионизированная форма трансформирует его в продукт. Эта гипотеза дает возможность упростить общую модель (см. рис. 6.33) путем удаления блоков «*a*» и «*h*». Используя выражения для скорости реакции (уравнение 6.15), получим:

$$\frac{v}{E_T} = \frac{k_{кат} \times [EHS]}{\underbrace{[EH]+[HEH^+]+[E^-]}_{\text{|...формы фермента «E»...|}}+\underbrace{[EHS]+[HEH^+S]+[E^-S]}_{\text{|...формы комплеса «ES»...|}}}. \tag{6.37}$$

В правой части этого уравнения все формы фермента можно выразить как *EHS*, используя ионизационные и кинетические уравнения (соответственно уравнения 6.34 и 6.36, а также уравнения на рис. 6.33). Поскольку все формы фермента находятся в равновесии, концентрацию любой из них можно выразить через концентрации других.

Затем, вынеся за скобки *EHS* и умножив обе части уравнения на E_T (а также используя уравнение (6.16)), а числитель и знаменатель правой части на S/K_M, а затем на K_M, получим:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{\underbrace{K_M(1+([H^+]/K_{E1})+(K_{E2}/[H^+]))}_{\text{|.....}f_E\text{.....|}}+\underbrace{[S](1+([H^+]/K_{ES1})+(K_{ES2}/[H^+]))}_{\text{|.....}f_{ES}\text{.....|}}}, \tag{6.38}$$

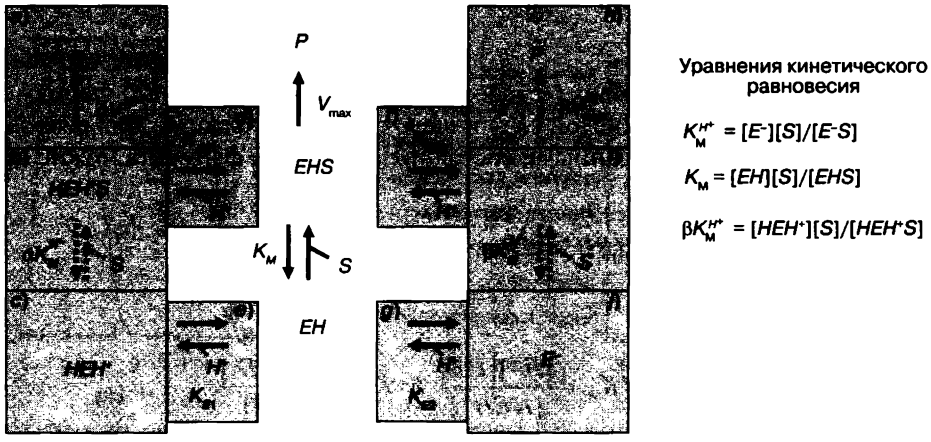


Рис. 6.33. Кинетическая модель влияния pH на активность фермента. По [28, 113, 140]

Это уравнение дает возможность выразить все формы свободного и связанного фермента через pH-зависимые члены f_E (так называемая pH-функция Михаэлиса) и f_{es}, соответственно*. Данные функции показывают количественное распределение или соотношение трех ионизационных состояний «*E*» или «*ES*» при любом pH в зависимости от H^+ и K_a (по существу они представляют собой кривые «титрования»). Деление числителя и знаменателя правой части уравнения 6.38 на f_{ES} позволяет увидеть, как ключевые кинетические константы зависят от pH:

$$v = \frac{V_{max}/f_{ES}\cdot[S]}{K_M((f_E)/(f_{ES}))+[S]}. \tag{6.39}$$

Таким образом,

$$V_{max}^{H^+} = \frac{V_{max}}{(1+([H^+]/K_{ES1})+(K_{ES2}/[H^+]))} \tag{6.40}$$

и

$$K_M^{H^+} = K_M\cdot\frac{f_E}{f_{ES}} = K_M\frac{1+([H^+]/K_{E1})+(K_{E2}/[H^+]))}{(1+([H^+]/K_{ES1})+(K_{ES2}/[H^+]))}. \tag{6.41}$$

Отношение этих модифицированных кинетических констант составляет:

$$\frac{V_{max}^{H^+}}{K_M^{H^+}} = \frac{V_{max}}{K_M\cdot(f_E)} = \frac{V_{max}}{K_M(1+([H^+]/K_{E1})+(K_{E2}/[H^+]))}. \tag{6.42}$$

Таким образом, член $V_{max}^{H^+}$ описывает *только* поведение всех форм «ES» (*f*ES), а член $V_{max}^{H^+}/K_M^{H^+}$ — только поведение всех форм свободного «E» (f_E; ср. также уравнения 6.19 и 6.22) при изменении pH.

Влияние pH на активность ферментов можно проиллюстрировать на примере папаина (рис. 6.34, *a–c)* [71], для которого характерен широкий pH оптимум (5–7). Оценки величин оптимальных V_{max} и K_M позволили автору работы [71] получить из уравнений (6.40) и (6.42) значения pK_a соответственно 4,0 и 8,2 и 4,2 и 8,2 (рис. 6.34, *a, b*) (при графическом определении pK_a опускали перпендикуляры из точек на кривых, соответствующих 50% от максимального значения ординаты). Поскольку K_M** слабо зависит от pH (рис. 6.34, *c*), можно полагать, что pH-индуцируемая ионизация фермента почти не влияет на связывание субстрата; эффект pH может быть отнесен исключительно к его влиянию на каталитическую стадию. В случае папаина каждому pH-переходу соответствует одна ионизируемая группа, причем все ионизируемые формы свободного фермента способны связывать субстрат, но только форма *EHS* – трансформировать *S* в *P*. Таким образом, уравнение (6.37) адекватно описывает поведение папаина, и блоки *a* и *h* из рис. 6.33 можно не включать в модель с $\alpha = \beta = 1$ для $K_M^{H^+}$ Зависимость активности папаина (V_{max}) от значения pH (рис. 6.34, *a*) аналогична случаю, описанному на рис. 6.32, *a*.

Для более полного анализа влияния pH [113] прологарифмируем уравнения (6.40)–(6.42):

$$\log V_{max}^{H^+} = \log V_{max} - \log\left[1+\frac{[H^+]}{K_{ES1}}+\frac{K_{ES2}}{H^+}\right]; \tag{6.43}$$

$$\log\frac{V_{max}^{H^+}}{K_M^{H^+}} = \log\frac{V_{max}}{K_M} - \log\left[1+\frac{[H^+]}{K_{E1}}+\frac{K_{E2}}{H^+}\right]; \tag{6.44}$$

и

---

* Отметим, что рассматриваемые pH-функции Михаэлиса выведены относительно формы *EHS*. Их можно вывести также относительно любой формы *E*, и хотя эти функции имеют разный вид, поведение фермента при данном наборе K_a и $[H^+]$ они описывают одинаково. — *Примеч. авт.*

** Изменения K_M меньше чем в два раза считаются несущественными; значимыми являются различия в три и более раз. — *Примеч. авт.*

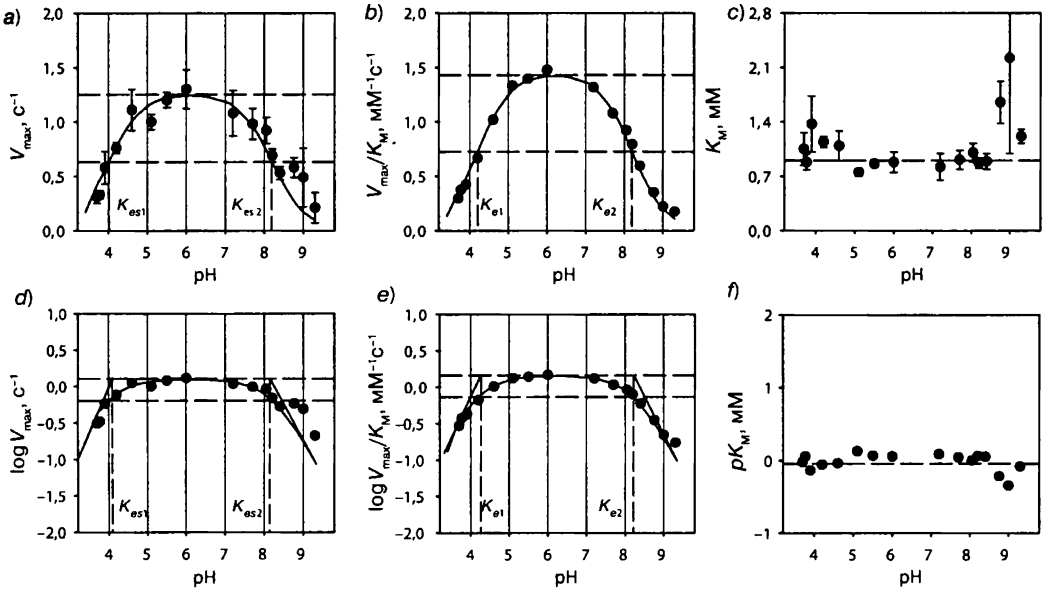


Рис. 6.34. Анализ зависимости активности папаина от pH. По [71]

$$\log K_M^{H^+} = \log K_M - \log\left[1+\frac{[H^+]}{K_{ES1}}+\frac{K_{ES2}}{H^+}\right]+\log\left[1+\frac{[H^+]}{K_{E1}}+\frac{K_{E2}}{H^+}\right]. \qquad (6.45)$$

Результаты представим в графической форме в «координатах Диксона» (см. рис. 6.34, *d–f*). Отметим, что по оси ординат отложены значения pK^{H^+} ($p = -\lg$). Представление уравнений в логарифмической форме делает pH-зависимости свойств ферментов более наглядными и понятными (рис. 6.34, *d–f*). Значение V_{max} легко определить по плато (наклон примерно равен 0), а оптимум pH находится посередине между значениями pK_a. По наклонам наиболее «крутых» частей восходящего и нисходящего участков кривых можно определить число ионизируемых аминокислотных остатков, определяющих кислотный ($+n$) и щелочной ($-n$) pH-переходы. В случае папаина зависимости Диксона имеют наклоны +1 и −1, то есть можно считать, что каждый pH-переход обусловлен изменением степени ионизации одного аминокислотного остатка. Наклоны зависимостей Диксона обычно изменяются в пределах от 1 до 3. Множественные ионизируемые группы дают более кооперативные переходы (см. кривую 2 на рис. 6.32, *b*).

Зависимости Диксона дают возможность определить значения pK_a двумя способами. Поскольку точка, где pH = pK_a отвечает «полупротонированному» состоянию ионизируемой группы (групп), активность фермента должна быть равна половине максимальной. Следовательно, в логарифмической (lg) шкале в координатах Диксона pK_a будет находится вблизи pH, определенной по точке пересечения pH-кривой с линией, проведенной параллельно оси абсцисс через ординату, на 0,3 единицы меньше максимальной. По второму способу определения pK_a продлевают восходящий и нисходящий участки кривой до пересечения с горизонтальной прямой, отвечающей максимальной активности, и опускают из точки пересечения перпендикуляр на ось *x*. Иногда выбор способа зависит от имеющихся данных. Для папаина (рис. 6.34, *d–f*) оба способа дают практически одинаковые значения pK_a: 4,1 и 8,1, 4,2 и 8,2 для связанного и свободного фермента соответственно. Аминокислотными остатками с ионизируемыми группами, имеющими такие pK_a, являются *GLU/ASP* и *CYS* (см. табл. 6.9), но фактически pH-зависимость папаина определяется имидазол-тиолатной (*HIS-CYS*) ионной парой, действующей как единое целое (см. рис. 6.23). CYS_{25} активен в диссоциированной форме, тогда как условием функционирования активного центра является протонирование HIS_{159}. Этот пример наглядно показывает, как меняется ионизация аминокислотных остатков в белках по сравнению с ионизацией собственно аминокислот в растворе (см. табл. 6.9).

Рассмотренная модель описывает pH-зависимость разных ферментов. Установлено, например, что в случае ксилозоизомеразы изменение pH с 5 до 8 (на практике используется интервал pH 7–8) не влия-

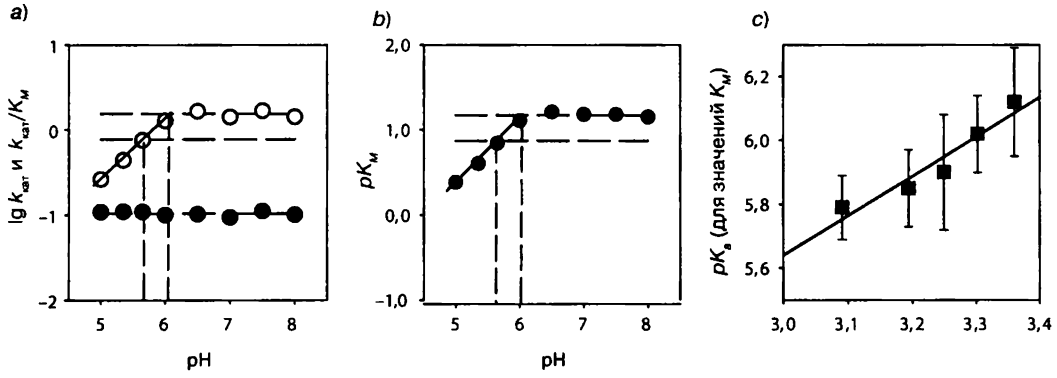


Рис. 6.35. pH-зависимость активности ксилозоизомеразы. Белыми кружками на графике (*a*) обозначены значения $k_{кат}/K_м$, а черными — $k_{кат}$. По [133]

ет на способность фермента превращать субстрат в продукт (lg $k_{кат}$ не зависит от pH, рис. 6.35, *a* [133]). Единичный наклон, отвечающий кислотному переходу, свидетельствует, однако, что ионизируемое состояние единственной ионизируемой группы фермента влияет на связывание субстрата (K_M изменяется, рис. 6.35, *b*), и поскольку $k_{кат}$ не изменяется, то $\Delta K_M = \Delta K_S$. Целью определения величин pK_a является выявление аминокислотных остатков, ответственных за pH-чуствительность ферментов. Значение pK_a ионизируемой группы ксилозоизомеразы составляет 5,7–6,1, что, по-видимому, соответствует гистидиновому остатку (см. табл. 6.9). Для дальнейшего анализа в целях уточнения роли аминокислотных остатков зачастую используют уравнение Вант-Гоффа (уравнение 6.31, рис. 6.30, *a*), основанное на значениях ΔH_{ion}. В случае ксилозоизомеразы значение ΔH_{ion} (5,6 ккал/моль, рис. 6.35, *c*) также свидетельствует об ионизации имидазольных остатков (см табл. 6.9).

6.4.2.4. Другие типы pH зависимости активности ферментов

На активность ферментов может влиять ионизация субстрата, продукта или ингибитора. Кроме того, ионизация боковых цепей аминокислотных остатков способна изменять селективность реакции по отношению к потенциальным субстратам. Например, многие протеазы характеризуются разными pH-оптимумами гидролитической активности по отношению к разным белковым субстратам [48].

6.4.3. Активность ферментов и содержание влаги

Контроль содержания влаги и доступности воды в пищевых продуктах очень важен для их хранения, поскольку содержание влаги существенно влияет на активность и стабильность ферментов, являясь средой для диффузионных процессов, регулирования разбавления или концентрирования. Она стабилизирует или пластифицирует белки, а также играет роль косубстрата в гидролитических реакциях. Уменьшение содержания влаги при сушке или замораживании обусловливает взаимосвязанные изменения в пищевых продуктах, влияющие на ферментативные реакции [36, 39, 112].

6.4.3.1. Дегидратация и активность воды

Основная цель дегидратации (как удаления внутренней воды, так и воды с поверхности продукта) — это уменьшение роли воды как среды для диффузии и ее действия как косубстрата. Содержание влаги лучше всего характеризуется термодинамической величиной — активностью воды a_w, показывающей, как ведет себя вода по отношению к растворенным веществам, в том числе ферментам.

Например, при a_w от 0 до 0,1 лизоцим прочно связывает воду (монослой) заряженными и высокополярными группами. При a_w 0,1–0,4 вода взаимодействует с менее полярными доменами белка, в том числе с пептидным каркасом. При $a_w > 0{,}40$ в водные полислои входит кондесационная влага, и доля объемной воды и воды как растворителя возрастает. Значения a_w, при которых изменяется состояние воды в пищевом матриксе, зависят от его состава. Влияние значения a_w на ферментативные реакции исследовалось

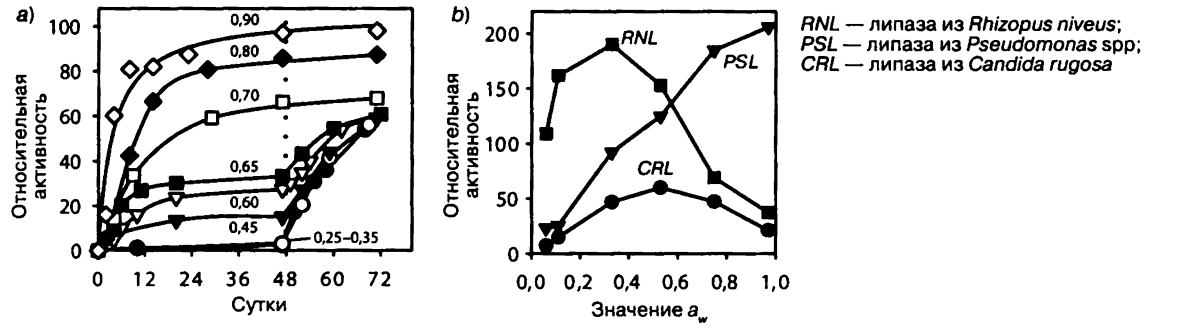


Рис. 6.36. Активность фермента в зависимости от значения a_w: *a* — относительная активность фосфолипазы из измельченного ячменного солода при 2% лецитина и 30 °С в зависимости от увеличения a_w до 0,70 через 48 сут при начальном a_w 0,25–0,65; *b* —активность различных липаз в синтезе эфиров. По [1, 139]

в 1950–1980-е гг. (пример такого влияния приведен на рис. 6.36, *a*) [1, 139]. Снижение a_w с 0,90 до 0,35 приводит к замедлению гидролитических процессов и достижению состояния, близкого к равновесному, характеризующегося ограниченным гидролизом. Следствием последующего увеличения a_w является продолжение реакции до уровня, характерного при начальной активности воды. Таким образом, эффект воды является обратимым. В пищевых и биологических матриксах влияние воды объясняется капиллярными эффектами, ограничивающими степень протекания реакции при малой активности воды. Установлено, что подобное поведение характерно для активности липазы, фосфолипазы, инвертазы и других ферментов. Так, активность (скорость и степень протекания реакции) полифенолоксидазы при уменьшении a_w с 1,0 до 0,60 снижается на 90–95% [126]. В реакциях синтеза эфиров для липаз из различных источников характерны неодинаковые и четко выраженные оптимумы a_w (рис. 6.36, *b*).

Для осуществления каталитической функции ферментам необходима разная минимальная активность воды. При a_w, равной или ниже a_w монослоя, способность молекул к конформации («пластичность») ограничена, однако некоторые ферменты сохраняют свою активность. Хотя реакционная способность ферментов в этих условиях ограничена, их термостойкость повышается, поскольку конформационные изменения и развертывание белков также ограничены и для них при температурах денатурации существует меньше возможностей. Минимальная активность воды, необходимая для проявления ферментом активности в пищевых матриксах и модельных системах, составляют для оксидоредуктаз 0,25–0,70, а для гидролаз 0,025–0,96 (табл. 6.10 [36]). Даже низкая остаточная ферментативная активность может влиять на качество содержащего некоторое количество влаги пищевого продукта при длительном его хранении.

Таблица 6.10
Минимальные значения a_w, необходимые для активности некоторых ферментов. По [36]

Ферменты	Матрикс/Субстрат	Минимальное a_w
Амилазы	Ржаная мука	0,75
	Хлеб	0,36
	Крахмал	0,40–0,76
Фосфолипазы	Макаронные изделия	0,45
	Лецитин	0,45
Протеазы	Пшеничная мука	0,96
Липазы	Растительное масло, трибутирин	0,025
Фитаза	Зерно, крупы	0,90
Глюкозооксидаза	Глюкоза	0,40
Фенолоксидаза	Катехол	0,25
Липоксигеназа	Линолевая кислота	0,50–0,70

Другой эффект, вызванный снижением a_w, обусловлен влиянием на равновесные реакции гидролиза (эффект действия масс). Так, для $AB + H_2O \leftrightarrow A' + B'$

$$K_{eq} = \frac{[A'] + [B']}{[AB] \times [H_2O]}. \tag{6.46}$$

При уменьшении a_w сдвиг равновесия приводит к накоплению AB. Этот эффект применяется на практике при использовании липаз в микроводной среде (< 1% H_2O) (см. рис. 6.26) для получения липидов с улучшенными свойствами. В синтезе аспартама реакции образования пептидной связи, катализируемые термолизином, проводят при оптимальном содержании влаги около 2–3% [78]. Наиболее активны ферменты обычно при $a_w > 0{,}90$.

Сочетание нехватки диффузионной среды и способности фермента к конформации может привести к изменениям механизма реакции и ее продуктов [36, 112]. При снижении a_w с 0,95 до 0,75 состав мальтоолигосахаридов, получающихся при действии α-амилазы на крахмал, изменяется — содержание гетерогенных олигомеров с количеством глюкозных единиц от 1 до 7 снижается в сторону преимущественного образования олигомеров с 1–3 глюкозными единицами. Данный факт свидетельствует о том, что гидролиз протекает уже не случайным образом. Ограниченная диффузия фермента и субстрата делает ферментативную атаку более направленной, поскольку из-за малой мобильности реагентов сегменты крахмала подвергаются гидролитическому действию в одном или соседних участках многократно. По той же причине нехватка диффузионной среды при a_w 0,65 приводит к изменению состава конечных продуктов реакций с участием липоксигеназы — содержание продуктов конденсации линолеата увеличивается при соответствующем уменьшении количества гидропероксидов жирных кислот. Очевидно, что недостаточная мобильность гидропероксидов позволяет им дольше находиться поблизости и участвовать в свободнорадикальных реакциях конденсации между двумя молекулами.

Снижение a_w может повлиять также на константы скорости и равновесия ферментативных реакций. Например, при снижении a_w с 1,0 до 0,85 pH-оптимум полифенолоксидазы смещается более чем на 0,5 ед. pH [126]. Такое изменение обусловлено ослаблением диэлектрического характера среды и соответствующим повышением pK_a ионизируемых групп, важных для осуществления ферментом каталитической функции. Липаза характеризуется минимальной K_M при a_w около 0,4 [36], что объясняется изменением свойств фермента или природой поверхности раздела фаз с субстратом.

При определенных составе и значении a_w пищевых или модельных матриксов может наблюдаться стеклование, при котором движение молекул существенно ограничено по сравнению с «резиноподобным» или более текучим состоянием (см. главу 2). В некоторых случаях в стеклоподобном состоянии ферменты более стабильны, однако их стабильность как для стекло-, так и для резиноподобного состояния в средах с малым содержанием влаги зависит от температуры [108]. Вопреки ожиданиям, переход от стекло- к резиноподобному состоянию не приводит к существенному повышению активности фермента [24]. Специфические факторы могут сильнее модулировать ферментативную активность и/или стабильность в средах с низким содержанием влаги, чем просто наличие стеклоподобного состояния.

Наконец, после дегидратации увеличивается вязкость остающейся жидкой фазы и ухудшаются условия для протекания ферментативных реакций вследствие снижения диффузии реагентов и продуктов. Это влияние вязкости на активность ферментов можно оценить, используя инертные «вискогены»-загустители (глицерин, сахарные спирты, полимеры). Показано, что при увеличении вязкости уменьшается скорость контролируемых диффузией ферментативных реакций, а также процессов, характер скоростьлимитирующей стадии которых (например, стадии диссоциации) изменяется. Диффузионно-контролируемыми ферментативными реакциями принято считать реакции, у которых значения $k_{кат}/K_M$ равны примерно 10^8–10^9 $M^{-1} \cdot c^{-1}$, что соответствует скоростям диффузионно-лимитируемых бимолекулярных реакций между крупной и небольшой молекулами [138]. В ранних работах замедление реакций с участием инвертазы при больших концентрациях сахарозы связывали именно с увеличением вязкости, но позднее было показано, что это замедление обусловлено главным образом субстратным ингибированием [76]. Этот пример показывает, насколько трудно бывает объяснить влияние изменения содержания влаги действием какого-либо одного фактора, поскольку одновременно действуют и другие факторы окружающей среды.

6.4.3.2. Осмотические эффекты дегидратации

При дегидратации пищевых продуктов или добавлении к жидкости растворимых веществ концентрация их в растворе возрастает. Следовательно, при дегидратации увеличиваются ионная сила и осмоляльность. Стабильность и в большей степени активность ферментов в гиперосмотической среде зависит от природы и концентрации растворенных веществ. Ионные компоненты раствора подразделяют на всаливающие и высаливающие, что проявляется соответственно в их дестабилизирующем и стабилизирующем действии на белки (см. главу 5). Ферменты по-разному реагируют на присутствие растворенных веществ и изменения их концентраций при дегидратации. Многие практически важные процессы с участием пектиназ, протеаз и ферментов, обеспечивающих преобразования сахаров, проходят в гиперосмотической среде (в 10–40%-ных растворах субстратов). К счастью, многие субстраты (сахарные спирты, сахара, аминокислоты) являются стабилизаторами белка [148] и повышают его устойчивость к термической денатурации [39, 148].

Другая особенность концентрированных растворов — это наличие благоприятных условий для протекания обратных реакций (особенно гидролитических) благодаря эффектам действия масс (см. уравнение (6.46)). Обратные реакции с липазами могут использоваться для синтеза и изменения строения эфиров (см. рис. 6.26). Медиаторами процессов транспептизации являются пластеины, образуемые протеазами при высоких концентрациях пептидов. Эти реакции дают возможность вносить лимитированные аминокислоты. Использование глюкоамилазы (рис. 6.19) позволяет ограничить содержание нежелательной изомальтозы (α, 1–6-связь) за счет обратных гидролитических реакций. β-Галактозидаза участвует в реакциях переноса гликозила при высоких концентрациях лактозы, в результате чего образуются олигомеры галактозы и глюкозы, обладающие пребиотическими свойствами.

В природе некоторые ферменты подвергаются постоянному гиперосмотическому стрессу. Примерами организмов, живущих в гиперосмотической среде, являются все морские организмы (концентрация NaCl в соленой воде составляет около 3,5%), растения и микроорганизмы-обитатели солоноватых вод, соленых почв, минеральных источников, а также глубоководных морских кратеров. В создание гиперосмотических условий вносят свой вклад также замораживание и дегидратация. Для уменьшения отрицательного влияния гиперосмотических сред и сред с высокой ионной силой предлагается использовать осморегулирующие системы. Осмопротекторными свойствами обладают полиолы (глицерин, маннит, сорбит), сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза, трегалоза), аминокислоты (особенно *GLY, PRO, GLU, ALA,* β-*ALA*) и некоторые метилированные амины (рис. 6.37). Многие эти соединения имеют функциональные группы –OH (способные образовывать водородные связи), NH_4^+, $R_xNH_y^+$, $-CH_2-COO^-$ и SO_3^{2-}, способные повышать стабильность белков, полностью подавляя или уменьшая действие дестабилизирующих ионов (Na^+, K^+, Cl^-), а также мочевины и аргинина.

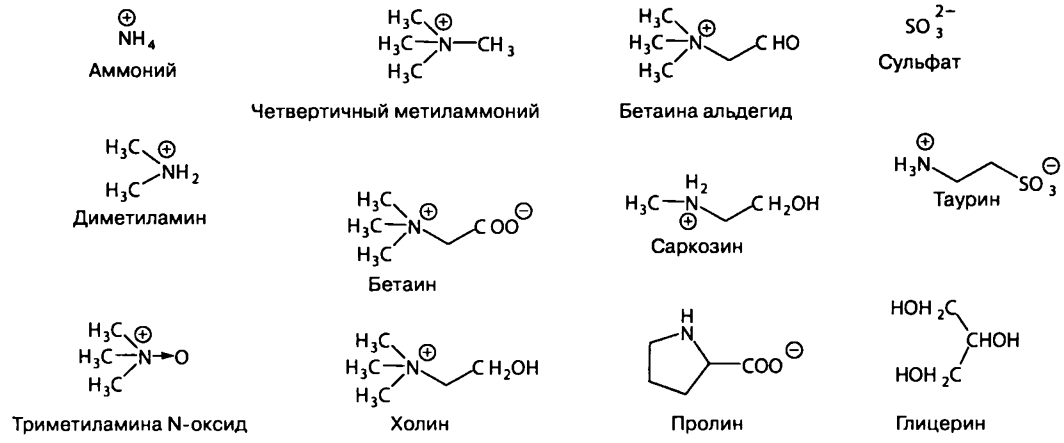


Рис. 6.37. Соединения с осмопротекторными свойствами

Считается, что механизм действия осмопротекторов включает стерическое отталкивание растворенного вещества и белка (способствующее структурированию воды и компактности белка, характерному для нативного состояния) и прямое взаимодействие «растворенное вещество–белок» (образованием водородных связей). Особого внимания заслуживают два осмопротектора — метилированные амины и трегалоза. В тканях морских организмов содержится до 100 ммоль триметиламин-N-оксида (*TMAO*). Этот эндогенный осмолит защищает тканевые ферменты от дестабилизирующего действия (нежелательных изменений K_M) солей и даже мочевины (мощного денатурирующего соединения, присутствующего в тканях акул и скатов). Сходное по строению соединение — бетаин — уменьшает ингибирующее влияние хлорида натрия на ферменты растительных тканей, подвергающиеся солевому стрессу. Одним из наиболее эффективных осмопротекторов является трегалоза (глюкопиранозил-α-1,1-глюкопиранозид), которая образует водородные связи с белками и способствует структурированию воды путем стабилизации белков при дегидратации и замораживании [148]. Осмопротекторы добавляют также в ферментные препараты для их стабилизации при замораживании и сублимационной сушке (многие из этих препаратов содержат менее 10% активного белка, а оставшаяся часть — это наполнитель или носитель, в состав которого могут входить крио- или осмопротекторы).

Для оптимального функционирования некоторых ферментов при водном стрессе требуется присутствие ионных компонентов, выделяемых в том числе из галотолерантных или галофильных микроорганизмов. Ряд таких ферментов был эмпирически подобран для использования в качестве различных стартовых культур для ферментации в присутствии соли (например, в производстве сыра или соевого соуса). Применяемые в этих процессах ферменты должны обладать необходимой стабильность и активностью. В ряде случаев активность ферментов стимулируется солями — так, активность термолизина, используемого в синтезе аспартама (подсластителя), в растворе NaCl с концентрацией 4 моль/дм^3 при оптимальном pH около 7 возрастает в 12 раз (рис. 6.38) [58]. Стимулирующая способность одновалентных катионов снижается в следующем порядке: $Na^+ > K^+ > Li^+$ [58]. Соли влияют только на стадию, характеризующуюся константой $k_{кат}$, и не влияют на связывание субстрата; кроме того, наблюдается сдвиг pK_a кислотной группы с 5,4 до 6,7, тогда как pK_a основной группы (pH около 7,8) практически не меняется. Концентрированные растворы солей активируют ферменты за счет электростатических взаимодействий на поверхности и активном центре, в результате чего белок претерпевает конформационные изменения. Такой фермент очень хорошо подходит для синтеза пептидов при высоких концентрациях косубстрата.

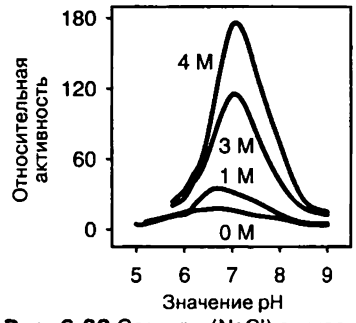


Рис. 6.38 Солевая (NaCl) активация термолизина. По [58]

6.4.3.3. Дегидратация при замораживании

Замораживание отличается от других процессов дегидратации более низкими температурами (ниже 0 °C) и тем, что объемная вода удаляется в виде твердой фазы. Таким образом, факторами, определяющими активность фермента при замораживании и влияющими на вязкость и диффузию, являются температура и повышенная концентрация растворенных веществ. Активность воды для замороженных продуктов менее важна, чем для дегидратированных сред, поскольку она зависит от относительного давления водяного пара льда и переохлажденной воды при одной и той же температуре; при –20 °C значение a_w не превышает 0,82 (см. главу 2). Хотя процессы замораживания (как модельных систем, так и реальных пищевых матриксов) были подробно исследованы еще в 1960–1980-х гг., в наше время интерес к ним не сокращается, что связано, прежде всего, с изучением особенностей криоконсервации биологических систем под действием низких температур.

Суммарное действие замораживания на ферментативные реакции можно описать следующим образом. Понижение температуры всегда приводит к уменьшению $k_{кат}$ и скорости реакции. Концентрационные эффекты более разнообразны и определяются начальными концентрациями в незамороженном растворе субстратов, ингибиторов, эффекторов, кофакторов и буферирующих веществ, а также суммарными эффектами, связанными с повышением их концентраций при удалении воды в виде льда. Растворенные вещества могут дестабилизировать ферменты за счет осмотического и/или ингибирующего эффекта (осо-

бенно если $S > K_M$), вследствие чего скорость реакции уменьшается. Таким образом, в целом замораживание должно приводить к снижению скорости реакции. Некоторое повышение активности фермента возможно за счет увеличения концентрации субстрата или положительного эффектора, но оно лишь компенсирует уменьшение скорости из-за снижения температуры. Тем не менее, иногда концентрационные эффекты становятся доминирующими, особенно при небольших начальных концентрациях субстрата, и в результате замораживания скорость реакции возрастает.

Образование кристаллов льда приводит по крайней мере к трем последствиям. Кристаллы льда могут разрушить клеточную структуру и способствовать смешиванию фермента и растворенных веществ, находившихся ранее в различных клеточных компартментах. В результате декомпартментализации скорость реакции при температурах от −3 до −12 °С, а иногда и до −20 °С, повышается. Размеры кристаллов льда, зависящие от скорости замораживания и рекристаллизации, также влияют на скорости реакций в замороженных системах. При быстром замораживании образуются кристаллы примерно одного размера и более мелкие, дисперсные пулы жидкой фазы. Это сохраняет «отделенность» фермента и реагентов, особенно при их нахождении в разных частях клетки, даже если чистый концентрационный эффект замораживания эквивалентен эффекту при медленном замораживании до той же конечной температуры. Третье следствие связано со скоростью замораживания — несмотря на то что долгое время считалось, что чем быстрее замораживание (от 1 до 100 °С/мин), тем лучше сохраняются активность и стабильность фермента, чаще наблюдается обратное [19, 122]. Быстрое замораживание сопровождается образованием небольших кристаллов льда с большей площадью поверхности, чем у кристаллов, образующихся при медленном замораживании, и при этом создаются неблагоприятные условия для сохранения жидкой фазы. В присутствии небольших кристаллов, по-видимому, ускоряется поверхностная денатурация ферментов. Некоторые белки не столь чувствительны — внутриклеточные барьеры могут смягчать или, наоборот, усиливать этот эффект. В любом случае медленное замораживание позволяет лучше сохранить свойства фермента при хранении. Отметим, что активность фермента при хранении водных систем в замороженном состоянии уменьшается значительно сильнее, нежели при хранении лиофилизированных порошков, не содержащих льда.

На сохранение активности ферментов в биологических системах влияет и скорость размораживания (таяния). Постепенное снижение скорости таяния с 10 до 0,1 °С/мин приводит у ряда ферментов в модельных растворах к увеличению потери ими активности; интервал температур, соответствующий максимальной дезактивации фермента, лежит в пределах от −10 °С до температуры таяния [19, 42]. Рекристаллизация льда в процессе размораживания может обусловливать дополнительное поверхностное натяжение и дальнейшую денатурацию белка. Установлено, что медленное размораживание способствует частичной денатурации белков в пищевых матриксах, например, аллиназы репчатого лука [136].

Еще одним следствием замораживания является увеличение вязкости жидкой фазы, что снижает содержание необходимой для диффузии влаги. Низкие температуры ограничивают скорость и глубину протекания реакций (рис. 6.39) [10, 40]. Известны попытки количественно описать влияние вязкости на свойства щелочной фосфатазы в замороженных растворах сахарозы [23]. Щелочная фосфатаза широко распространена в природе, и в переработке молока ее используют как индикатор термического процесса. Этот фермент относится к числу очень активных (отношение $k_{кат}/K_M$ составляет 10^6–10^7 $M^{-1} \cdot c^{-1}$), скорость реакции которых близки к диффузионным. Определенные экспериментально значения $k_{кат}/K_M$ хорошо соответствовали предполагаемым с учетом эффекта вязкости и объясняли поведение фермента в частично замороженных растворах. Следует отметить, что к снижению скоростей более медленно реагирующих ферментов может привести и действие других факторов. Одним из таких факторов,

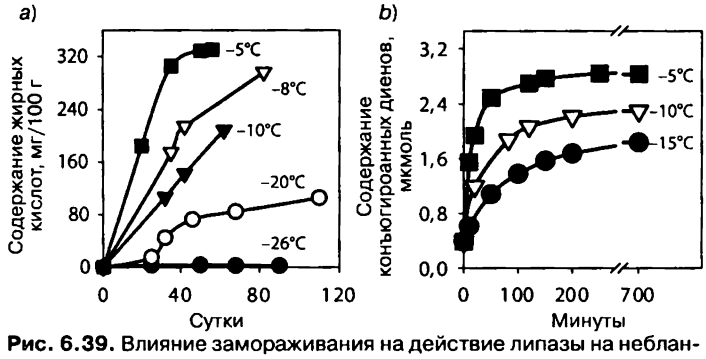


Рис. 6.39. Влияние замораживания на действие липазы на неблан-шированный зеленый горошек (*a*) и окисление линолевой кислоты липоксигеназой в модельных реакциях (*b*). По [10]

прежде не упоминавшимся, является эвтектическое поведение и вызванные им изменения pH и ионного состава, способных повлиять на активность и стабильность фермента. Чувствительность фермента к замораживанию зависит также от концентрации фермента и белка в среде, причем чем больше эти концентрации, тем лучше сохраняется ферментативная активность (по-видимому, благодаря стабилизирующим взаимодействиям «белок–белок». В заключение отметим, что стабильность ферментов в присутствии крио- и осмопротекторов (трегалозы, других сахарных спиртов и сахаров) повышается.

6.5. Эндогенные ферменты пищевых продуктов и их контроль

В этом разделе мы рассмотрим основные свойства эндогенных ферментов пищевых продуктов и способы регулирования их активности, продолжающие оставаться в центре внимания специалистов по пищевой химии. Основное внимание мы уделим природе и распределению ферментов в тканях, сложностям в их поведении и взаимодействиях, а также возможностям регулирования их активности физическими и химическими методами. Такие сложные и взаимосвязанные биохимические процессы, как процессы созревания овощей и фруктов, изменения свойств растительного сырья после сбора урожая или животного сырья после убоя, а также генетические методы мы здесь затрагивать не будем, поскольку они рассмотрены в других главах.

6.5.1. Клеточные и тканевые ферментативные эффекты

Ферменты, влияющие на качество и технологию переработки пищевых продуктов, обычно исследуют в очищенном или частично очищенном виде, что дает возможность определить присущие им свойства. Такие исследования *in vitro* зачастую проводят при концентрациях фермента от 10^{-7} до 10^{-12} М. Ускоренный расчет на основе гипотетического продукта, содержащего 10% белка и состоящего из 1000 различных белков со средней массой 100 кДа, позволяет определить среднюю концентрацию белкового вещества — 10^{-6} М [113]. Естественно, концентрация некоторых индивидуальных белков может быть существенно выше концентрации других, и поэтому диапазон концентраций может быть достаточно широким ± 3 порядка (10^{-3}–10^{-9} М). Следовательно, средние концентрации ферментов в пищевых и биологических матриксах (табл. 6.11) на несколько порядков превосходит их концентрации *in vitro*. Кроме того, в табл. 6.11 не учтены различия между концентрациями ферментов в разных частях клетки, которые могут достигать десяти и более раз. Структурная гетерогенность и неодинаковое распределение эндогенных компонентов между дискретными фазами характерна даже для нетканевых продуктов (молока и яиц).

Компартментализация ферментов и их концентрация *in vivo* по-разному влияют на их свойства в пищевых продуктах. Особенно это влияние проявляется у олигомерных ферментов, усиливающаяся диссоциация которых при разбавлении приводит к уменьшению скорости реакций, протекающих с участием олигомерных форм. В этом случае диссоциация по мере разбавления увеличивается, благодаря чему снижается кинетический характер, свойственный реакциям с участием олигомерных ферментов (аллостерия). Соотношения между E и S могут также меняться при изменении $[E]$, хотя теоретически такие константы, как K_M, от $[E]$ не зависят. Показательным примером может служить мышечная фосфофруктокиназа, влияющая на скорость гликолиза после убоя при превращении мышечной ткани в мясо (рис. 6.40, *а*) [9,83]. При физиологических концентрациях фермента (500 мкг/мл, около 10^{-6} М), $S_{0,5}$ равна 0,5 ммоль, тогда как при 5 мкг/мл (около 10^{-8} М) $S_{0,5}$ более чем в десять раз выше (6,4 ммоль). Кроме того, при более низком содержании фермента ингибирование АТФ (косубстрата) в присутствии активатора (фруктозо-2,6-бифосфата) проявляется более отчетливо — K_I равно 1,2 мМ (при физиологических концентрациях фермента K_I составляет 10 мМ). Еще одним отличием поведения фермента *in situ* является возможное его влияние на активность других компонентов. В присутствии фруктозобисфосфатазы скорость реакции с участием фосфофруктокиназы описывается уравнением гиперболического типа с $S_{0,5}$, равной 2,9 ммоль, тогда как без фруктозобисфосфатазы наблюдается аллостерическая кинетика с более высокой $S_{0,5}$ (9,2 ммоль, см. рис. 6.40, *b*). Таким образом, фруктозобисфосфатаза может «активировать» фосфофруктокиназу в мышечной ткани *in situ* за счет структурных или метаболических эффектов.

Еще одним фактором, от которого зависит активность ферментов *in situ*, является относительный уровень ферментов, субстратов и кофакторов, поскольку за два последних могут конкурировать несколько

Таблица 6.11
Концентрация ферментов в некоторых пищевых продуктах и тканях

Фермент	Источник	Фактическое содержание	Концентрация, ммоль	Примечания
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Мышечная ткань (мясо)	> 1% масс. по сырому веществу	0,34	К родственным метаболическим ферментам относятся альдолаза (0,15 мМ) и лактатдегидрогеназа (0,11 мМ); существуют и мультиферментные комплексы
Пероксидаза	Корень хрена	20% белка	0,2	Изоформы могут быть цитозольными или пластидными
Липидацилгидролаза	Клубни картофеля	~30% белка	0,2	Запасной белок, локализованный во вневакуольной мембране; в почке клубня его содержание выше
Аллиназа	Луковица речатого лука	~6% белка	0,02	Вакуоли (в репчатом луке); в шелухе чеснока ее содержание выше
	Головка чеснока	~10% белка	0,2	
Панкреатин (смесь пищеварительных протеаз)	Поджелудочная железа	~0,04 г/г сухой массы	~ 1,0 общей протеазы	Трипсин, химотрипсин и эластаза могут существовать в виде зимогенов и активных форм

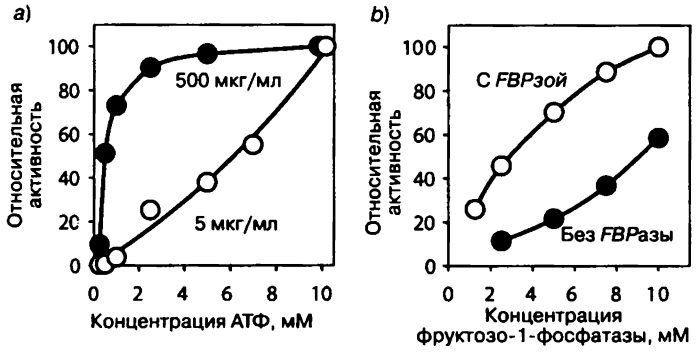


Рис. 6.40. Влияние имитированных *in situ* условий на активность фосфофруктокиназы (*a*) и фосфофруктокиназы (*b*) в присутствии и в отсутствие фруктозобисфосфатазы (*FBP*азы). По [9, 83]

ферментов. Например, промежуточные метаболиты гликолиза имеют концентрацию 20–540 мкМ, а гликолитические ферменты — 32–1400 мкМ [121]. Таким образом, субстраты могут лимитировать как первичный, так и вторичный метаболические пути. Установлено, что квазистационарные концентрации $NAD^+/NADH$ примерно составляют 540/50 мкМ; конкуренция оксидоредуктаз за них в биологических системах и относительные значения $K_м$ часто определяют вид фермента, принимающего участие в реакции (в «свободном» состоянии $NAD^+/NADH$ практически не присутствуют). Активность ферментов *in vitro,* наоборот, часто определяют при избытке (ко)субстратов и $[S]$ от 10^{-6} до 10^{-2} М.

Понятно, что компартментализация является ключевым фактором, контролирующим действие ферментов в пищевых и биологических системах, но означает она не просто разделение их мембранами в органелле или другими физическими барьерами. Будучи связанными с другими белками, мембранами или даже полисахаридами ферменты могут отделяться от других ферментов или субстратов. Сокомпартментализация ферментов, обусловленная их взаимодействием и связыванием друг с другом, образование ассоциатов определяет метаболические пути для превращений субстратов и интермедиатов в конечные продукты реакций, отделяя их от метаболических цитозольных или диффузионных пулов в клетках. Ферменты могут быть также отделены в виде латентных форм за счет действия других факторов, в том числе локальных значений pH или ионной силы (или их градиентов), присутствия обратимого ингибитора, отсутствия активатора или кофактора, а также необходимостью протеолитической активации зимогенных форм.

В некоторых случаях присутствие ферментов в пищевых продуктах можно легко определить. Одним из проявлений является простое разрушение ткани. По вкусу или наличию ферментативного потемнения можно судить о наличии вызывающих их ферментов. Например, действие липоксигеназы на липиды дает или прогорклый, или приятный вкус и запах. Ферментативное потемнение чая при химической «ферментации» желательно, а у свеженарезанных фруктов и овощей оно нежелательно.

6.5.2. Активность ферментов и цвет пищевых продуктов

6.5.2.1. Фенолоксидазы

Ферментативное потемнение (побурение) может быть обусловлено действием ферментов фенолазы, фенолоксидазы, полифенолоксидазы, катехолазы, крезолазы и тирозиназы. Эти ферменты широко распространены в микроорганизмах, растительных, животных и человеческих тканях, в которых отвечают за пигментацию кожного покрова. Общей структурной единицей этих ферментов является двухъядерный медный активный центр типа 3, катализирующий вторую или обе приведенные ниже реакции:

$$\text{Монофенол} + O_2 + 2H+ \rightarrow \textit{o}\text{-Дифенол} + H_2O, \quad (6.47)$$

$$\textit{o}\text{-Дифенол} + 1/2(O_2) \rightarrow \textit{o}\text{-Хинон} + H_2O. \quad (6.48)$$

Первая реакция представляет собой гидроксилирование и классифицируется как активность монофенолмонооксигеназы (ЕС 1.14.18.1), а вторая — окисление, катализирующееся 1,2-бензолдиол : кислород-оксидоредуктазой (ЕС 1.10.3.1). Первая реакция катализируется крезолазой (*p*-крезол относится к монофенолам и используется в качестве субстрата в процессах гидроксилирования и последующего окисления). Катехол — это простейший *o*-дифенол (1,2-бензолдиол), и таким образом крезолаза и катехолаза катализируют стадии гидроксилирования и окисления дифенола. Термином «тирозиназа» называют ферменты, ускоряющие и реакции гидроксилирования, и окисления; слово «тирозиназа» восходит к названию фермента, встречающегося в грибах *(Agaricus bisporus)* и действущего на эндогенный субстрат тирозин. Действие ферментов не ведет непосредственно к образованию коричневых пигментов. В дальнейшие реакции конденсации с аминами и белками с образованием красно-коричневых полимерных и конъюгированных соединений, называемых «меланинами», вступают продукты реакции (6.48), а именно *o*-хиноны [119, 130, 137].

Оба атома меди в ферменте прочно связаны с тремя гистидиновыми остатками (в случае катехолазы батата — $HIS_{88,109,118}$ и $HIS_{240,244,274}$); эта последовательность наиболее характерна для большинства высоко консервативных фенолоксидаз и родственных двухъядерных медных ферментов [38, 119]. Ферменты высших растений — это моно- или гомоолигомеры с молекулярной массой мономера 30–45 кДа. Тирозиназы зачастую гликозилированы и существуют в многочисленных изоформах, обладающих разной селективностью относительно субстрата. Механизм их действия включает двухэлектронные редокс-реакции (рис. 6.41) [38, 119]. В тканях фермент присутствует в виде *MET*-форм (Cu_{II}–Cu_{II}–OH^-, около 85%) и *OXY-форм* (Cu_{II}–Cu_{II}–O_2^{2-}, около 10–15%), и изолируют его чаще всего в *MET*-форме. Окисление дифенолов катализируют обе формы (на рис. 6.41 цикл быстро проходит по периметру). В одном полном цикле для образования двух молекул воды необходима одна молекула кислорода и четыре электрона от субстрата. В части цикла, начинающейся с деокси-формы, O_2, по-видимому, образует уникальный пероксидный мостик (окси-форму) и получает электроны от Cu_I–Cu_I.

Для гидроксилирования зачастую характерен лаг-период, так как для этой реакции требуется менее распространенная *OXY*-форма фермента; кроме того, заместители в фенольном кольце могут создавать стерические барьеры для *o*-гидроксилирования [119]. Последовательно протекающие стадии гидроксилирования показаны на рис. 6.41 как внутренний цикл, в результате которого из одного моля O_2 образуется один моль H_2O. Монофенолы, по-видимому, подвергаются последовательному гидроксилированию и окислению в одном каталитическом цикле. Дифенолы активируют реакцию фермента с монофенолами и уменьшают лаг-период, способствуя быстрому превращению *MET*-формы в *OXY*-форму (см. уравнение 6.47, но вместо $2H^+$ будет стоять донор атома водорода BH_2). Взаимное конкурентное ингибирование окисления *o*-дифенолов монофенолами и *o*-гидроксилирования монофенолов *o*-дифенолами согласуется с совмещающимися и частично расходящимися циклами для обоих типов субстратов. Низкие уровни пероксида водорода могут активировать тирозиназу, превращая *MET*-форму в *OXY*-форму. Избыток H_2O_2 дезактивирует фермент (по-видимому, вследствие образования крипто-окси-радикала, генерируемого двухъядерным Cu_2-пероксидным комплексом, разлагающим гистидиновые лиганды, которые удерживают Cu в активном центре). Хотя в некоторых ранних работах сообщалось о ферментах, обладающих только крезолазной активностью, в настоящее время понятно, что все эти ферменты обладают и катехолазной

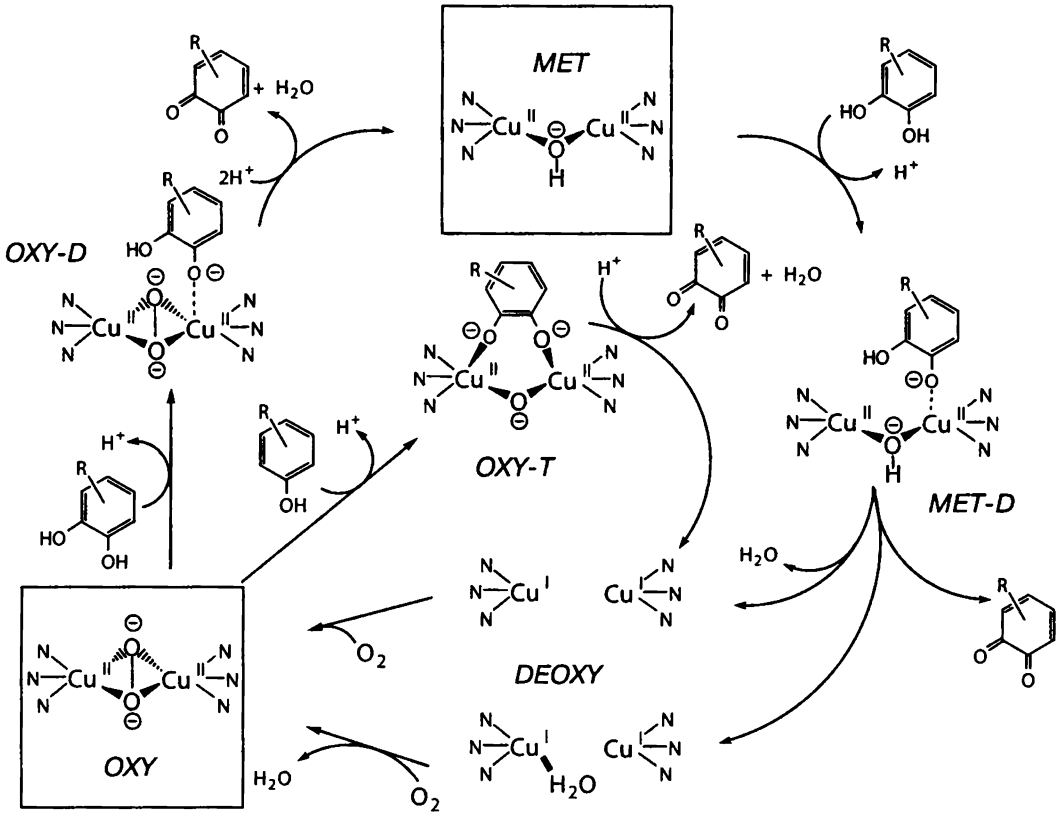


Рис. 6.41. Механизм реакции и полифенолоксидазный цикл. Доминирующие природные формы ферментов приведены в квадратах. *OXY*-форма координируется с двумя молями атомарного кислорода, а *MET*-форма — с $^{-}$OH. Некоторые формы содержат связанные активным центром дифенол (*D*) или монофенол (*T*). По [38, 119]

активностью; активность обоих типов соотносится от 1 10 до 1 40 [149]. Большая часть катехолаз проявляет и крезолазную активность.

Ферментативное потемнение свойственно креветкам и другим ракообразным, у которых этот дефект называют «черным пятном». В его формировании участвует гемоцианин — медьсодержащий белок, вовлеченный у ракообразных в транспорт кислорода. По своему строению гемоцианин очень похож на тирозиназу. К другому типу ферментов, широко распространенному в растениях и грибах и способному окислять дифенолы, но не обладающему крезолазной активностью, относятся лакказы (EC 1.10.3.2). Эти ферменты участвуют в процессах ферментативного потемнения, однако их свойства (за исключением некоторых различий в чувствительности к ингибиторам) напоминают свойства *о*-дифенолоксидаз, и здесь мы не будем их специально рассматривать.

Считается, что фенолоксидазы защищают растения от действия паразитов и патогенов [137]. Механизм действия фенолоксидаз растений представляет собой классическую активацию за счет декомпартментализации, поскольку фермент является в основном пластидным (хлоропласты и хромопласты), может быть на 95–99% латентным и образовывать комплексы с ингибиторами (например, с оксалатом). Субстраты компартментализованы в других местах (в вакуолях или специализированных клетках) или существуют как предшественники. При разрушении ткани латентные дифенолоксидазы могут активироваться кислотой, а также при контакте с субстратами (из вакуолей), за счет протеолиза зимогена или действия различных химических активаторов, особенно ПАВ. Продукты ферментативной реакции (*о*-хиноны) весьма реакционноспособны и могут дезактивировать ферменты, секретируемые инвазивными организмами. Полимеризация *о*-хинонов (меланоз) может обеспечивать также физический барьер для паразитов и патогенов.

Вызываемый фенолоксидазами процесс потемнения желателен для изюма, чернослива, какао-бобов, чая, кофе и яблочного сока. Фенолоксидазы образуют дитирозиновые сшивки, что может быть полезно там, где требуется «текстуризация» белка (при гелеобразовании и улучшении клейковины при хлебопечении). *In vivo* тирозиназа принимает участие в синтезе беталаина. Однако в большинстве случаев потемнение фруктов и овощей (особенно не подвергнутых обработке) ассоциируется с низким качеством продукта. Из-за присутствия фенолоксидаз в зерне (например, в пшенице) ухудшается белизна макаронных изделий и, следовательно, их качество.

В овощах и фруктах фенолоксидазы наиболее активны при pH 4,0–7,0, однако на оптимум pH влияют некоторые субстраты. Зависимость от pH определяется одной ионизируемой группой и проявляется во влиянии на связывание субстрата (K_M-стадию), но не на каталитическую (V_{max}) стадию или общую конформацию фермента. Температурный оптимум для фенолоксидаз составляет 30–50 °C, причем их термостойкость сравнительно высока и характеризуется в зависимости от источника периодом полужизни при температуре 55–80 °C в несколько минут. Таким образом, при термообработке создаются хорошие условия для активации фенолоксидаз, поскольку нагревание до температур примерно 60–65 °C приводит к повреждению клеток (декомпартментализации) и смешиванию фермента с субстратом.

Предпочтения ферментом того или иного субстрата зависят от его источника и изоформы. К наиболее известным природным или эндогенным субстратам относятся производные кафеоил-хинной, кафеоилвинной и кафеоил-шикимовой кислот, катехин и другие соединения, приведенные на рис. 6.42, значения K_M для которых составляют 0,5–20 мМ. Некоторые субстраты при высоких концентрациях выступают ингибиторами.

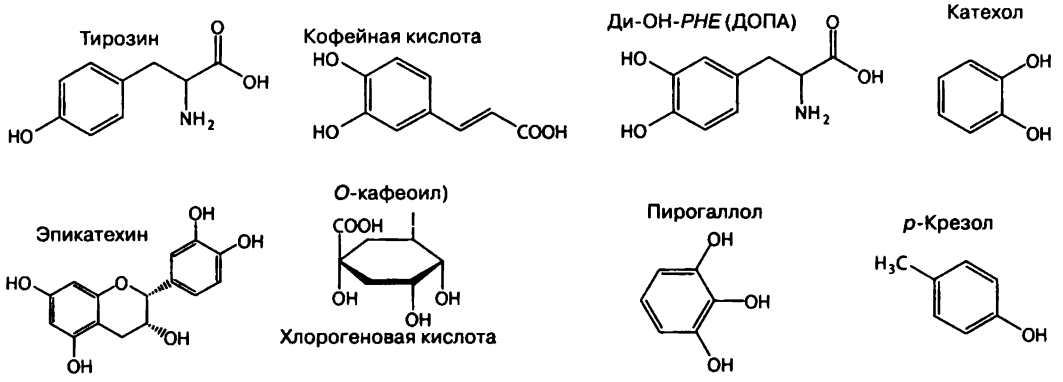
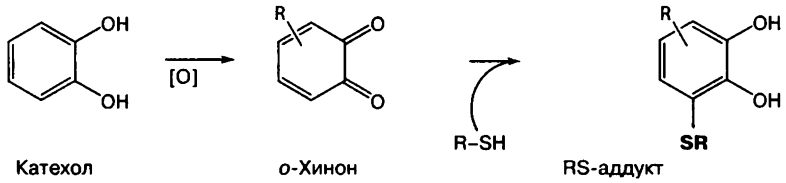


Рис 6.42. Субстраты полифенолоксидазы

Существует несколько способов устранения ферментативного потемненния — дегидратация, замораживание, тепловая обработка, а также упаковывание минимально обработанных продуктов в РГС-упаковку, глазирование тканей (особенно замороженных) сахарным сиропом или покрытие съедобной пленкой для ограничения доступа кислорода. Такой подход позволяет достичь K_M для O_2 около 50 мкМ. Поскольку концентрация кислорода в насыщенных воздухом водных растворах при 25 °C составляет около 260 мкМ, очевидно, что можно значительно снизить концентрацию кислорода в растворе, однако слишком большое снижение концентрации кислорода может привести в действие анаэробный метаболизм, зачастую сопровождающийся образованием неприятного запаха. Хотя некоторые фенолоксидазы могут инактивироваться (реакцией с *о*-хиноном), это происходит лишь после тысяч каталитических циклов, из-за чего их инактивация не является эффективным способом предотвращения ферментативного потемнения.

Наиболее часто применяемым способом предотвращения потемнения является химическая обработка внесением реагентов, ингибирующих или дезактивирующих фермент, образующих комплексы с природными субстратами, восстанавливающих хиноны до *о*-дифенолов и/или связывающих хиноны, что предотвращает образование меланина. Соединения, играющие исключительно роль восстановителей, замедляют потемнение только до момента их исчезновения. Некоторые восстановители, особенно тиолы, способны связывать хиноны с образованием неполимеризующихся продуктов реакции, однако этот

эффект также ограничен во времени, так как концентрация тиолов по ходу приведенной ниже реакции уменьшается:



(6.49)

Катехол *о*-Хинон RS-аддукт

Использование ингибиторов ферментов подкислителей, комплексообразователей и дезактиваторов ферментов позволяет обеспечить более длительный эффект. Подкислители (лимонная, яблочная и фосфорная кислоты) снижают активность ферментов без нежелательных побочных эффектов. Ингибиторы, сходные по строению с природными субстратами (рис. 6.43), могут конкурировать с ними за фенолсвязывающий участок.

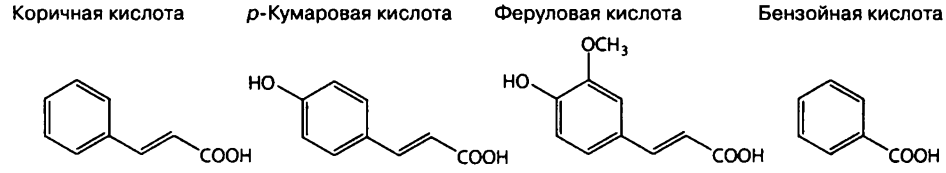


Рис. 6.43. Ингибиторы полифенолоксидазы

Комлексообразователи (ЭДТА, щавелевая и лимонная кислоты, а также соки, содержащие эти органические кислоты — лимонный, ревеневый) координируют медь в активном центре, однако это не всегда приводит к ингибированию ферментов. Гистидин связывает медь достаточно прочно (lg K_{assoc} 10–18), и поэтому многие хелаторы меди не могут удалить медь из активного центра фермента (lg K_{assoc} = 15–19 для ЭДТА и 4–9 — для оксалата). Конкурентные ингибиторы (галогениды, CO, цианид, некоторые тиолы) координируют медь в активном центре и понижают активность фермента. Перспективными реагентами, образующими комплексы с природными субстратами и снижающими тем самым доступ к ним ферментов, являются хитозан и циклодекстрины, однако их применение ограничено жидкими продуктами. Другим фенолсвязывающим матриксом, используемым главным образом в научных исследованиях для выделения фенолоксидаз, может служить нерастворимая форма поливинилпирролидона (*PVP*). Использование этого метода, однако, может снижать пищевую ценность соков, поскольку фенольные и родственные им соединения обладают полезными для здоровья свойствами (см. главу 12).

Ингибирующими свойствами относительно ферментативного потемнения обладают такие восстановители, как сульфиты, аскорбиновая кислота, цистеин и трипептид глутатион. Они восстанавливают *о*-хиноны до дифенолов или химически их связывают, замедляя тем самым образование меланина. Этот эффект ограничен по времени, поскольку в ходе реакции концентрация восстановителей снижается. Более важна необратимая ковалентная инактивация фенолоксидаз этими реагентами (активность фермента после инкубации в течение продолжительного времени в отсутствие субстрата не полностью восстанавливается после диализа,) [82]. По-видимому, подобные ингибиторы координируются с медью, а последующие редокс-процессы в аэробных условиях сопровождаются образованием в активном центре так называемых «криптооксирадикалов» («скрытых» оксирадикалов), идентификация которых представляется весьма непростой задачей. Под действием этих радикалов гистидиновые лиганды разрушаются, по-видимому, высвобождается медь, и фермент инактивируется. Действие ингибиторов в поврежденных тканях определяется кинетическими факторами, то есть их способностью связывать и конкурентно инактивировать фермент быстрее, чем последний взаимодействует с субстратами. В противном случае ингибитор будет расходоваться, а его эффективность снижаться. Сульфиты и тиолы ингибируют потемнение дольше, чем аскорбиновая кислота, поскольку фермент быстрее инактивируется [82]. Относительно недавно ингибиторные свойства к фенолоксидазе были выявлены у тропалона и 4-гексилрезорцинола (рис. 6.44). По строению они похожи на субстраты и прочно связывают медь в активном центре, а их ин-

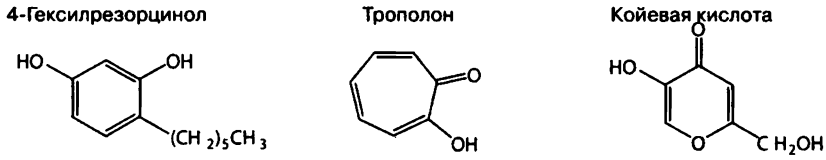


Рис. 6.44 . Ингибиторы полифенолоксидазы

гибирующая способность проявляется при концентрациях около 1 мкМ. 4-Гексилрезорцин был выделен из экстракта фигового дерева, источника фицина (протеазы), и используется прежде всего для контроля образования черных пятен у ракообразных вместо сульфитов, применение которых все более сокращается из-за вызываемых ими проблем со здоровьем, особенно у больных астмой. Как добавку к пищевым продуктам трополон использовать запрещено, однако его применение позволяет определить, чем именно вызвано потемнение — фенол- или пероксидазами. Еще одним типом ингибиторов фенолоксидаз являются пептиды меда и проростков кукурузы, механизм действия которых еще предстоит определить, а также различные небольшие циклопептиды [137]. Из культур *Aspergillus* и *Penicillium spp.* была выделена койевая кислота — эффективный ингибитор фенолоксидазы, координирующийся с медью в активном центре, однако его использование может быть ограничено только ферментированными пищевыми продуктами, при получении которых применяются указанные микроорганизмы (существуют данные об их токсичности для животных).

6.5.2.2. Пероксидазы

Пероксидазы широко распространены в растениях, животных и микроорганизмах. Их разделяют на пероксидазы растительного (в том числе микробиологического) и животного происхождения. Наиболее важны для пищевой биохимии растительные пероксидазы, в том числе прокариотического и грибкового происхождения, а также классические растительные пероксидазы [37, 130]. Растительные пероксидазы — гликозилированные, мономерные, гемовые (протопорфирин IX) белки с молекулярной массой 40–45 кДа, имеющие два сходных домена, образующихся при дупликации генов. Большинство пероксидаз растворимы, а остальные находятся в мембранно- и ковалентно-связанной форме (последние высвобождаются под действием ферментов, разрушающих клеточные стенки). Физиологическая роль пероксидаз состоит в образовании и разрушении лигнина, окислении растительного регулятора индолуксусной кислоты (вовлеченной в процессы созревания и связанные с ним катаболические процессы), обеспечении защиты от паразитов и патогенов, а также удалении клеточного H_2O_2. По изоэлектрической точке пероксидазы классифицируются на кислотные, нейтральные и основные. Наиболее изученной из них является нейтральная пероксидаза-С из корня хрена (ЕС 1.11.1.7, донор:H_2O_2 оксидоредуктаза), которую часто используют как модельную систему, поскольку ее свойства характерны и для других пероксидаз. Реакцию пероксидирования в наиболее общем виде можно записать следующим образом:

$$2AH \text{ (донор электрона)} + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + 2A^{\bullet}. \qquad (6.50)$$

Этот фермент может существовать в пяти окисленных состояниях, основным из которых является Fe^{III}-форма (рис. 6.45) [37]). Реакция с H_2O_2 протекает после его приближения к гемовому железу, при этом HIS_{42} действует как общее основание, образуя гидропероксил-анион (сильный нуклеофил), координирующийся с железом. Связанный с железом HIS_{170}, действуя затем как общее основание, донирует электроны пероксиду, после чего протекает гетеролитический разрыв связи О–О с образованием H_2O как отщепляемой группы (H^+ от HIS_{42} действует теперь как общая кислота) и пероксидазного соединения I (Fe^V=O). Таким образом, $2e^-$ от гемового Fe^{III} используются для восстановления H_2O_2 до H_2O. Две последовательные одноэлектронные стадии с участием H^+ и двух молекул донора AH возвращают фермент в исходное состояние (завершая цикл пероксидирования), при этом в качестве интермедиата образуется соединение II (H^+–Fe^{IV}=O) и выделяется еще одна молекула воды. Каждая из этих стадий протекают медленнее, чем образование соединения I. Наиболее легко пероксидазы ингибируются реагентами, присоединяющимися к гемовой простетической группе, например, цианидами, NaN_3, CO и некоторыми тиолами. Эти ингибиторы используются, однако, только для научных исследований пероксидаз. Кроме

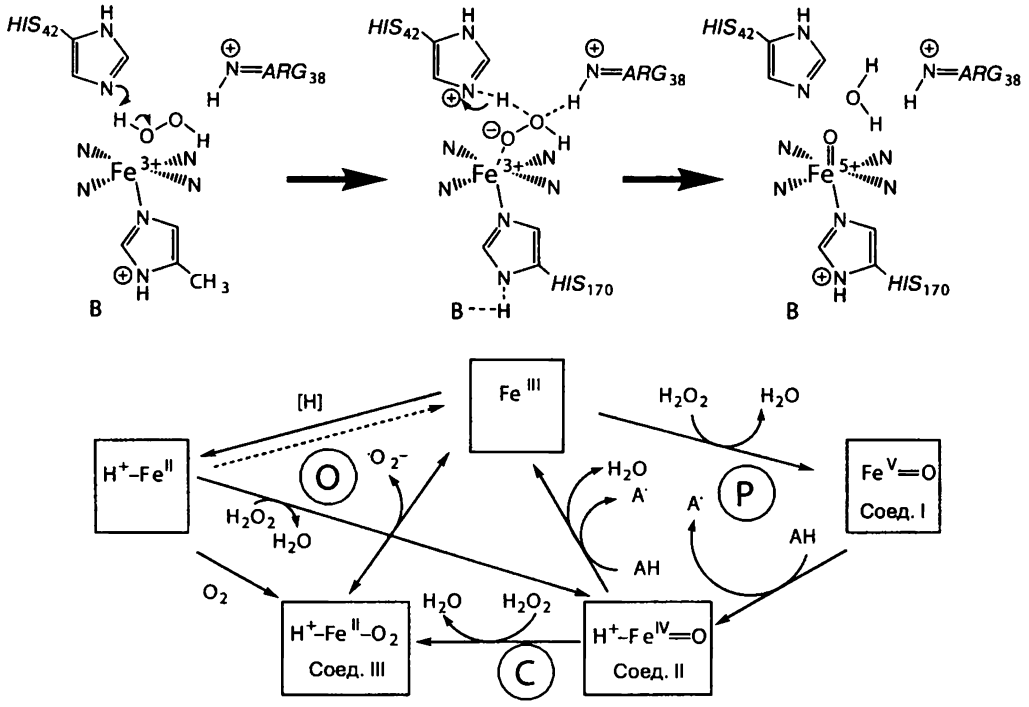
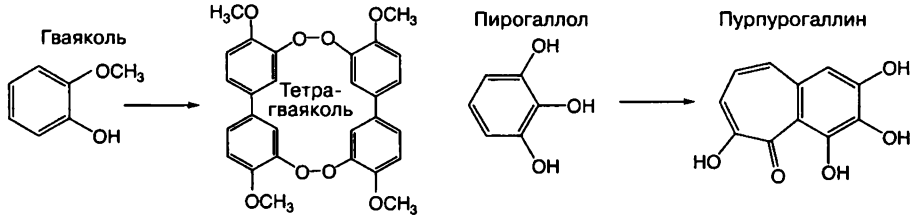


Рис. 6.45. Механизм реакции и пероксидазный цикл. Обозначения: P — цикл пероксидирования; C — каталитический цикл; O – окислительный цикл. По [37

того, поскольку роль пероксидаз в пищевых продуктах до конца не ясна, внесение в пищевые продукты специфических для них ингибиторов нельзя считать оправданным.

Донорами электронов для перевода соединения I в соединение II и обратно в Fe^{III}-пероксидазу могут служить фенолы (например, *p*-крезол, катехол, кофейная и кумаровая кислоты, см. рис. 6.42 и 6.43), аскорбиновая кислота, *NADH* и ароматические амины (например, *p*-аминобензойная кислота). Судьба двух частиц A•, возникающих в цикле пероксидирования, может быть разной. Если AH — аскорбиновая кислота, то 2A• будут давать молекулу аскорбиновой кислоты и молекулу дегидроаскорбата. Если же AH — гваяколь, то 2A• будут полимеризоваться с образованием тетрамеров коричневого цвета, что позволяет использовать гваяколь в качестве индикатора эффективности обесцвечивания.

Другой субстрат — пирогаллол — в результате свободнорадикальной гомоконденсации образует димер пурпурного цвета (пурпурогаллин). Стабильные свободные радикалы образуют токоферол, а радикалы тирозина могут конденсироваться с образованием димеров. Дитирозиновые сшивки в клейковине (глютене) улучшает ее вязкоупругие и хлебопекарные свойства.



(6.51)

При избытке H_2O_2 пероксидаза поддерживает процесс катализа за счет реакции со второй молекулой пероксида с образованием воды и соединения III (H^+–Fe^{II}–O_2) (см. рис. 6.45). Пероксидазы максимально активны по отношению к донорам AH-концентрации H_2O_2 3–10 мМ, и именно эти концентрации используются при анализе пероксидаз как индикаторные тесты обесцвечивания. При избытке H_2O_2 образуется соединение III, которое возвращается в исходное состояние довольно медленно, что приводит к недооценке пероксидазной активности.

Для пероксидаз характерны и другие уникальные реакции. В одной из них участвует *NADH*, который в присутствии следовых количеств H_2O_2 может выступать в цикле пероксидирования в качестве АН, в результате которого образуется 2 молекулы *NAD*•. Затем протекают следующие реакции:

$$NAD^{\bullet} + O_2 \rightarrow NAD + {}^{-}O_2^{\bullet}; \quad (6.52)$$

$${}^{-}O_2^{\bullet} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2; \quad (6.53)$$

$$NAD^{\bullet} + Fe^{III}\text{-пероксидаза} \rightarrow NAD + Fe^{II}\text{-пероксидаза} \quad (6.54)$$

$$Fe^{II}\text{-пероксидаза} + O_2 \rightarrow \text{оксипероксидаза (соединение III)} \quad (6.55)$$

$$\text{Оксипероксидаза} \rightarrow Fe^{III}\text{-пероксидаза} + {}^{-}O_2^{\bullet} \text{ (затем может протекать реакция 6.53)} \quad (6.56)$$

Таким образом, при использовании *NADH* в присутствии следовых количеств пероксида водорода пероксидаза обладает способностью генерировать свой собственный косубстрат (H_2O_2), что делает возможным осуществление обоих циклов пероксидирования и окисления.

Процессы окисления и гидроксилирования связаны с пероксидазами косвенно. Циклы пероксидирования и окисления с последовательным использованием *NADH* в качестве АН показывают, как именно пероксидазы могут образовывать реакционноспособные кислородные и оксирадикалы, обладающие окислительными свойствами. Окисление может происходить тогда, когда косубстрат дает частицы A•, способные отщеплять атомы водорода от других соединений. Это может инициировать протекание других свободнорадикальных реакций, в результате которых могут образоваться полимерные производные из фенольных соединений, обусловливающие потемнение, вызванное фенолоксидазной активностью. Таким образом, реакция пероксидазы с фенольным субстратом может вызывать непрямое (химическое) окисление другого субстрата, что затрудняет оценку эффективности прямого пероксидазного действия на компоненты такой сложной системы, как пищевой продукт. Фенольные субстраты, образующие частицы A•, дают также ${}^{-}O_2^{\bullet}$ и H_2O_2, которые могут участвовать в последующих окислительных реакциях. Таким образом, роль пероксидаз в процессах потемнения и обесцвечивания пищевых продуктов остается до конца не ясной, и полученных в последнее время данных о связи пероксидазной активности и степени потемнения еще недостаточно для достоверного определения роли пероксидаз.

Оптимальные значения pH для растительных пероксидаз находятся в диапазоне 4,0–6,0, но оптимальный диапазон pH для образования соединения I значительно шире: значения pK_a изменения активности составляют около 2,5 и 10,9. Переход в кислой области обусловлен остатком HIS_{42}, pK_a которого изменяется в пределах 2,5–4,1 в зависимости от состава среды. Такое необычно низкое значение pK_a гистидина показывает, что он присутствует в виде конъюгированного основания, образованного сеткой H-связей, облегчающей H^+-диссоциацию. Оптимум pH для пероксидазных реакций определяется стадиями, в которых АН возвращает в цикл Fe^{III}-пероксидазу. Соединение АН является не только донором электронов, но и донором водорода, и поэтому для выполнения роли субстрата оно должно быть протонировано (если имеет отщепляемый H^+), в связи с чем оптимум pH зачастую зависит от вида субстрата.

Пероксидазы относятся к числу наиболее распространенных и термостойких растительных ферментов, благодаря чему они широко применяются в качестве индикаторов обесцвечивания. Если эндогенные пероксидазы разрушены, то можно считать, что разрушены и другие ферменты, ухудшающие качество продукта. Эта стратегия не работает в случае чрезмерного нагревания, то есть когда перегрев приводит к ухудшению качества по другим причинам (например, вследствие изменения текстуры, ухудшения пищевых свойств или вымывания компонента). До сих пор не выявлено других ферментов, стабильных при повышенных температурах, легко определяемых и непосредственно влияющих на качество бланшированных и замороженных овощей, так что в настоящее время пероксидазы остаются лучшими индикаторами обесвечивания.

Влияние температуры на активность пероксидаз зависит от вида исходной ткани. Чаще всего диапазон оптимальных температур составляет 40–55 °C. Пероксидазы достаточно термостойки — для их полной инактивации в неповрежденных тканях овощей необходимо выдерживание при 80–100 °C в течение не-

скольких минут. Устойчивость пероксидаз к тепловому воздействию обусловлена присутствием гемовой простетической группы, гликозилированием, четырьмя дисульфидными мостиками и наличием двух ионов Ca^{2+}, участвующих в образовании солевых мостиков. Термостойкость пероксидаз обычно понижается при уменьшении pH в интервале pH 3–7 и при увеличении ионной силы. Восстановление пероксидазной активности наблюдается при pH 5,5–8,0 при кратковременной тепловой обработке типа бланширования. При этом активность гемовой группы активного центра возвращается к исходной. Более интенсивная тепловая обработка, например автоклавирование, снижает способность активного центра к восстановлению вследствие более значительных конформационных изменений и ковалентных реакций. Вместе с тем высвобождение гема может катализировать окислительные процессы, что приводит к некоторому ухудшению вкуса консервированных овощей. Еще одной катализируемой пероксидазой реакцией, влияющей на качество продуктов, является образование феноксирадикалов, опосредованно окисляющих липиды и непосредственно — капсаицин, едкий компонент различных видов перца.

Несмотря на то что роль пероксидазы в ферментативном потемнении до конца не ясна, достоверно установлено, что она разлагает некоторые пигменты, особенно беталаины столовой свеклы. При определенных условиях пероксидаза также участвует в процессе обесцвечивания хлорофилла.

6.5.2.3. Прочие оксидоредуктазы

Лактопероксидаза является пероксидазой молока и относится к классу пероксидаз животного происхождения. Молекулярная масса ее гликопротеинового мономера составляет 78 кДа. Она содержит Ca^{2+} и ковалентно связанный модифицированный протопорфирин IX. Активность лактопероксидазы в реакции с пероксидом водорода аналогична пероксидазе-С хрена; процесс протекает с промежуточным образованием пероксидазных форм. Особенностью лактопероксидазы является более высокая, чем у пероксидазы-С, активность в реакциях с галогенидами (особенно I^-) и близкими им по свойствам соединениями [37]. Очень интересна реакция с тиоцианатом (SCN^-), присутствующим в молоке и выступающим в цикле пероксидирования в роли AH:

$$2SCN^- + Enz\text{–}(Fe^{V}{=}O) \rightarrow 2SCN^{\bullet} + Enz\text{–}(Fe^{III}) \rightarrow SCN^- + HOSCN + H^+ \qquad (6.57)$$

Известно, что гипотиоциановая кислота (HOSCN) и ее конъюгированное основание (pK_a 5,3) гипотиоцианит ($OSCN^-$) обладают антимикробными свойствами. Таким образом, внесение небольших количеств H_2O_2 (а также SCN^-) в молоко позволяет осуществить так называемую «холодную пастеризацию», снижающую обсемененность сырого молока микроорганизмами, что особенно важно для (суб)тропического климата, где использование холодильников не всегда возможно. Ферментативно-генерируемый гипотиоцианит более эффективен, чем экзогенный реагент (возможно, благодаря адсорбции лактопероксидазы на поверхностях и частицах, что создает условия для образования $OSCN^-$ вблизи микроорганизмов).

Каталаза (ЕС 1.11.1.6) — это тетрамерный гемовый фермент, широко распространенный в природе и обладающий свойствами, близкими к пероксидазам. Основная его функция — детоксикация пероксида водорода в клетках, то есть превращение его в H_2O и $1/2O_2$. Каталаза весьма термостойка и может считаться индикатором бланширования. Анализ ее не сложен, и проводят его следующим образом: кружок фильтровальной бумаги погружают в гомогенизированную массу бланшированных овощей, а затем — в разбавленный раствор H_2O_2. Если в анализируемом образце присутствовала каталаза, то фильтровальная бумага будет плавать по поверхности, поддерживаемая пузырьками кислорода, образующегося из пероксида водорода под действием каталазы.

6.5.3. Ферменты, участвующие в формировании вкуса и аромата

6.5.3.1. Липоксигеназа

Несмотря на то что липоксигеназы были открыты и описаны более 70 лет назад, исследования их роли в пищевых продуктах продолжаются и в настоящее время. В отдельных ранних исследованиях использовались понятия «липоксидазной» и «каротиноксидазной» активности. Липоксигеназы (и родственные им оксигеназы) широко распространены в растениях, животных и грибах, хотя прежде они рассматривались как исключительно растительные ферменты [14, 22, 102, 141]. Механизм их действия и причины селек-

тивного действия мы уже рассматривали выше, а здесь мы рассмотрим некоторые реакции с участием липоксигеназ и вторичные превращения жирных кислот, а также их влияние на качество пищевых продуктов. Липоксигеназы могут быть как полезными, так и вредными — все зависит от типа продукта (примеры действия липоксигеназ приведены в работах [22, 141]).

Давно известно, что липоксигеназы негативно влияют на качество овощей, подвергнутых тепловой обработке, недостаточной для разрушения этого фермента. Особо чувствительны к действию липоксигеназ и окислительной порче бобовые (лущильные сорта фасоли, соевые бобы, зеленый горошек), поскольку в них велико содержание этого фермента (табл. 6.12) [45, 50, 63, 72, 135]). Разнообразие реакций с участием липоксигеназ может быть объяснено более полным циклом, нежели приведенный выше (см. рис. 6.8). Анаэробный цикл описывает реакции в отсутствие O_2 или при его недостатке в среде, включая активацию пероксидом основного состояния фермента (Fe^{II}), то есть перевод в активное состояние (Fe^{III}); этот процесс иногда называют «липопероксидазной» активностью (рис. 6.46) [56, 141, 144]). В результате такой активации высвобождается оксирадикальная частица ($XO^{\bullet}$), и начинают протекать свободнорадикальные реакции; этот цикл продолжается в отсутствие O_2 и сопровождается возникновением радикалов жирных кислот ($L^{\bullet}$). Если $XO^{\bullet}$ образуется из полиненасыщенной жирной кислоты, то она может подвергаться внутримолекулярной перегруппировке, в результате которой возникает реакционноспособный эпоксид. Таким образом, в анаэробных условиях многие липоксигеназы вызывают вторичные свободнорадикальные реакции соокисления. В аэробных условиях функционирует «нормальный» механизм (см. рис. 6.8). Некоторые липоксигеназы имеют меньшее сродство к жирной кислоте и интермедиатам реакции, так что гидропероксилрадикал ($LOO^{\bullet}$) может диссоциировать преждевременно по «петле низкого сродства» (рис. 6.46) до завершения нормального каталитического цикла. Для этого необходимо, чтобы фермент реактивировался пероксидом в анаэробном цикле. Установлено, что сродство к субстрату изоформы 3 липоксигеназы из семян гороха и соевых бобов в 20 раз меньше, чем у других ее изоформ из этих семян [7, 56]. Следовательно, именно эти изоформы преимущественно образуют $LOO^{\bullet}$ и вызывают дальнейшее самоокисление жирных кислот и реакции соокисления за счет возникновения реакционноспособных форм кислорода, в том числе синглетного ($^1O_2$), в аэробном цикле (большая часть изоформ вызывает соокисление только в анаэробном цикле). Аэробный и анаэробный циклы представляют собой альтернативные пути превращений фермента, причем они могут протекать одновременно. Соотношение этих путей не всегда определяется только содержанием O_2 — значительное влияние оказывают также кинетические характеристики каждой стадии, относительное содержание фермента, субстрата и интермедиатов, а также микроокружение фермента.

Липоксигеназы из разных источников отличаются изоформами, оптимумом pH, регио- и стереоселективностью (табл. 6.12). Они являются «растворимыми» ферментами, но различные изоформы локализуются в разных частях клетки, что отражает их уникальную роль в превращениях жирных кислот в исходной ткани [43]. К числу наиболее изученных относятся липоксигеназы соевых бобов, с которых и началась классификация этих ферментов [7]. Наиболее распространена в соевых бобах изоформа 1 с необычным оптимум pH (в щелочной области). Эта особенность, а также 13*S*-стереоселективность по продукту, явились основанием для отнесения ее к липоксигеназам первого типа. Изоформы

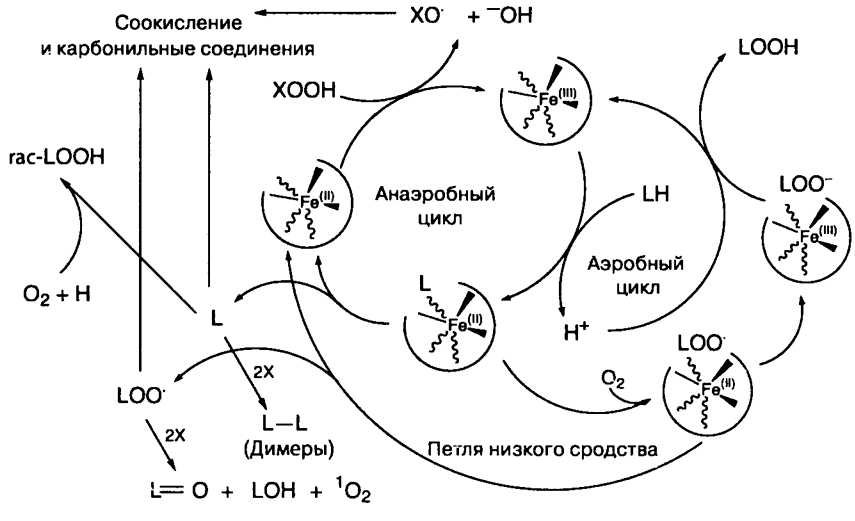


Рис. 6.46. Реакционные пути и циклы липоксигеназы. По [56, 141]

2 и 3 липоксигеназы соевых бобов имеют оптимум pH ближе к нейтральному и меньшую селективность по продукту, из-за чего были отнесены к липоксигеназам второго типа. В настоящее время установлено, однако, что липоксигеназы в основном имеют близкий к нейтральному оптимум pH и существенно различаются по селективности, что делает их классификацию по типам мало полезной. Более предпочтительна даже описанная ранее классификация на основе региоселективности оксигенирования арахидоновой кислоты (например, 5-*LOX*). Из табл. 6.12 следует, что многие липоксигеназы растений региоселективны при оксигенировании атома углерода С9 линолевой (или линоленовой) кислоты с образованием гидропероксида в *S*-конфигурации (*LOOH*). Некоторые липоксигеназы (особенно соевые изоформы 2 и 3, а также изоформы из семян гороха) регио- и стереоселективностью не обладают. Это их свойство обусловлено пониженным сродством к жирным кислотам [7, 56]. Если $L^{\bullet}$ высвобождается преждевременно, то взаимодействие с кислородом будет происходить случайным образом (неселективно), в результате чего образуются рацемические смеси *LOOH*, тогда как оксигенирование субстрата, находящегося в активном сайте, протекает регио- и стереоселективно (см. рис. 6.46).

Как мы уже отмечали, в присутствии изоформ, вызывающих реакции соокисления, образуются многочисленные продукты свободнорадикального самоокисления, в том числе альдегиды и кетоны (карбонилы). Соокисление сопровождается обесцвечиванием каротиноидов, и хотя это может привести к разрушению (про)нутриентов, этот процесс играет положительную роль при отбеливании теста и готовых мучных изделий (образование оксирадикалов может также улучшить прочность на разрыв и упруго-пластичные

Таблица 6.12
Свойства некоторых липоксигеназ и гидропероксидлиаз. По [45, 50, 63, 72, 93, 135]

Источник липоксигеназы (изоформа)	Относительная активность	pH-оптимум	Специфичность липоксигеназ 9:13, *S/R*	Специфичность гидропероксидлиаз	Доминирующие соединения в исходной ткани
Соевые бобы					
(1)	4200	9,0	4:96 13*S* (pH 9) 23:77 13*S* (pH 6.6)	*S*-13-*LOOH* (при низком содержании)	*n*-Гексаналь, гексанали, неприятные вкус и запах
(2)		6,5	50:50 9*R* > 95		
(3)		7,0	65:35 *R* ~ *S*		
Зародыши кукурузы		6,5	93:7 9*S*	(Следы/низкое содержание)	*n*-Гексаналь, неприятный запах (кетолы в семенах кукурузы)
Семена гороха (3 изоформы)	1800	6,6	67:33 *R* ~ *S* (pH 6,6) 59:41 13S, 9*R* (pH 9)	(Следы/низкое содержание)	Неприятный запах
Клубни картофеля	4600	5,5	95:5 9*S*	9/13-*LOOH*	*транс*-2-*цис*-6-нонадиеналь
Томаты (3 изоформы)	360	5,5	96:4 9*S*	13-*LOOH* (*CYP74B*)	*транс*-2-гексеналь, *цис*-3 -гексен-1 -ол, *n*-гексаналь
Огурцы	30–120	5,5	75:25	9,13-*LOOH*	*транс*-2-*цис*-6-нонадиеналь
Зеленый перец	300	5,5–6,0	Данные отсутствуют	13-*LOOH* (*CYP74B*)	*цис*-3-гексеналь, транс-2-гексеналь, *n*-гексаналь
Груши	Следы	6,0	95:5	9-*LOOH*	*транс*-2-*цис*-6-нонадиеналь
Яблоки	<120	6,0–7,0	15:85	13-*LOOH*	*n*-гексаналь, *транс*-2-гексеналь
Грибы	–	8,0	10:90 13*S*	5-10-*LOOH*	1-октен-3-ол, 1-октен-3-он
Листья чая		6,5	16:84 13*S*	5-13-*LOOH*	*транс*-2-гексеналь, *цис*-3-гексеналь, *n*-гексаналь

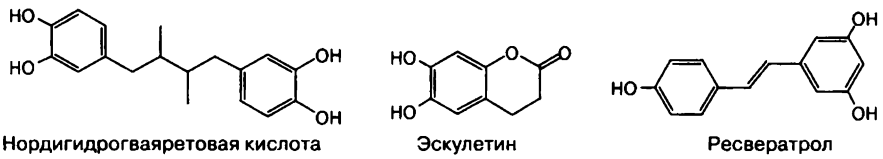
свойства теста). Поскольку липоксигеназа пшеницы обладает низкой обесцвечивающей способностью, для ее увеличения и обесцвечивания каротиноидов в тесто добавляют соевую, гороховую, картофельную муку или муку из нута (турецкого гороха). Соокислять каротиноиды способны также липоксигеназы из томатов и зеленого перца. Многочисленные изоформы липоксигеназ встречаются и во многих других растениях, в том числе злаковых, и в лущильной фасоли.

Таким образом, вызываемое липоксигеназами окислительное прогоркание может быть обусловлено двумя путями реакций (подробнее об этом см. главу 4). Одним из них является окисление линолевой и линоленовой кислот до *LOOH*, сопровождающееся образованием различных альдегидов и кетонов со специфическим запахом. По второму пути при непосредственном участии фермента в пищевом матриксе образуются радикалы жирных кислот, которые инициируют реакции соокисления и свободнорадикальные реакции самоокисления. Индикатором степени окисления жирных кислот может служить «бобовый» запах, присущий *n*-гексаналю. Среди приведенных в табл. 6.12 источников липоксигеназы наиболее склонны к прогоркланию соя, кукуруза и зеленый горошек, в связи с чем перед замораживанием и хранением кукурузы и горошка необходимо полностью дезактивировать липоксигеназу бланшированием; перед замораживанием соевых бобов — также бланшированием, перед помолом до муки — высушиванием, экстрагированием масла или получением белковых изолятов.

Некоторые различия в свойствах изоформ липоксигеназы используют для контроля качества пищевых продуктов. По способности вызывать прогорклый запах в бобах, соевом масле и пищевых продуктах на основе сои, в том числе соевом хлебе, оценивались изогенные линии сои, в которых отсутствуют определенные изоформы липоксигеназы. Было показано, что в гомогенизированных соевых бобах основным продуцентом *n*-гексаналя является липоксигеназа-2 [55]. В присутствии изоформ 1, 3 или их обеих способность изоформы-2 к образованию *n*-гексаналя снижается, что свидетельствует о зависимости превращений гидропероксидов жирных кислот от вида продуцирующей их изоформы. Если в тесто вносится мука линий сои, в которой отсутствуют специфические изоформы липоксигеназ, то наибольшее увеличение объема изделий наблюдается в присутствии изоформы-1, а наибольшее увеличение силы теста и его упругопластичности — в присутствии изоформы-2 [31]. Изоформа-2 обусловливает также образование нежелательных летучих веществ, в связи с чем в тесто следует вносить не более 1% муки из бобовых. Приведенные примеры свидетельствуют, что незначительные различия в свойствах ферментов могут влиять на технологию производства и качество пищевых продуктов.

Липоксигеназы и родственные им оксигеназы (циклооксигеназы) присутствуют и в животных тканях. Наибольшее значение для пищевиков имеют мышечные ткани [14, 22]. Липоксигеназы животного происхождения по структуре и механизму действия почти аналогичны липоксигеназам растений и грибов. Основное различие заключается в том, что природными субстратами липоксигеназ животного происхождения являются арахидоновая кислота и более длинноцепочечные полиненасыщенные кислоты, хотя они активны и относительно линолевой и линоленовой кислот. В свежей рыбе действие эндогенных липоксигеназ приводит к образованию желаемого вкуса и запаха (см. главу 10), но данных о связи липоксигеназ животного происхождения с качеством готовых изделий еще не достаточно.

Наиболее эффективным способом избежать негативных последствий действия липоксигеназ является тепловая обработка, вызывающая дезактивацию, но полезно также и регулирование значения pH. Известно много ингибиторов липоксигеназ. Обладающие фенол-антиоксидантными свойствами они тушат вторичные реакции окисления, практически не оказывая прямого воздействия на фермент. Непосредственно ингибируют липоксигеназу лишь несколько соединений (рис. 6.47), в том числе нордигидрогваяретовая кислота, катехолы и эскулетин (все при концентрациях около 10 мкМ), которые координируются с Fe в активном центре и/или восстанавливают железо в неактивное состояние Fe^{II}. Конкурентными ингибиторами являются также ресвератрол (в концентрации около 10 мкМ) и $SnCl_2$ (5 мМ).



Нордигидрогваяретовая кислота Эскулетин Ресвератрол

Рис. 6.47. Ингибиторы липоксигеназы

6.5.3.2. Гидропероксидлиаза и ее превращения

Неспецифическое (химическое) разложение гидропероксидов жирных кислот (*LOOH*), образовавшихся под действием липоксигеназ, приводящее к образованию карбонильных соединений с неприятным запахом, подавляется в присутствии ферментов, *специфически* превращающих *LOOH* в другие соединения [12, 135]. Во многих овощах и фруктах таким эффектом обладают гидропероксидлиазы, продуктами действия которых являются соединения с 6, 9 и 12-ю атомами углерода (рис. 6.48, табл. 6.12) [12, 43, 135]. Этот процесс включает стадии высвобождения жирной кислоты из глицеролипида под действием липидоацилгидролазы, диоксигенации жирной кислоты с образованием 9/13-гидропероксидов под действием липоксигеназы, расщепления 9/13-гидропероксидов гидропероксидлиазой, изомеризации (по возможности) и конечного превращения альдегидов в спирты под действием алкогольдегидрогеназы. Наличие этого пути было впервые показано на примере образования бананового аромата, а участие ферментов в этом процессе было доказано на примере огурцов и томатов [45, 50, 135].

Пути превращений жирных кислот в желаемые ароматические вещества зависят от совместного действия и специфичности липоксигеназы и гидропероксидлиазы, а также относительного количества вспомогательных ферментов. Например, хотя основным продуктом действия липоксигеназы в плодах томатов является 9-*LOOH* (см. табл. 6.12), специфичность гидропероксидлиазы (отношение скоростей ее взаимодействия с 9- и 13-*LOOH* составляет 1 62) приводит к тому, что в поврежденных тканях в основном образуются С6- и С12-фрагменты. И наоборот, гидропероксидлиаза огурцов обладает малой специфичностью (отношение скоростей ее взаимодействия с 9- и 13-*LOOH* составляет 2 1), и доминирование С9-фрагмента среди продуктов окисления жирных кислот определяется прежде всего селективностью липоксигеназы. Примеры, приведенные в табл. 6.12, можно объединить в группы «с огуречным запахом» (обусловленным нонадиеналями), «чайно-листовыми» и «с цветочно-фруктовыми ароматами» (обусловленными гексеналем, гексаналями и гексенолами). Вместе с тем не все продукты реакций внутри данной группы (С9 или С6) имеют одинаковый запах, и причиной этого является то, что действуют и другие фак-

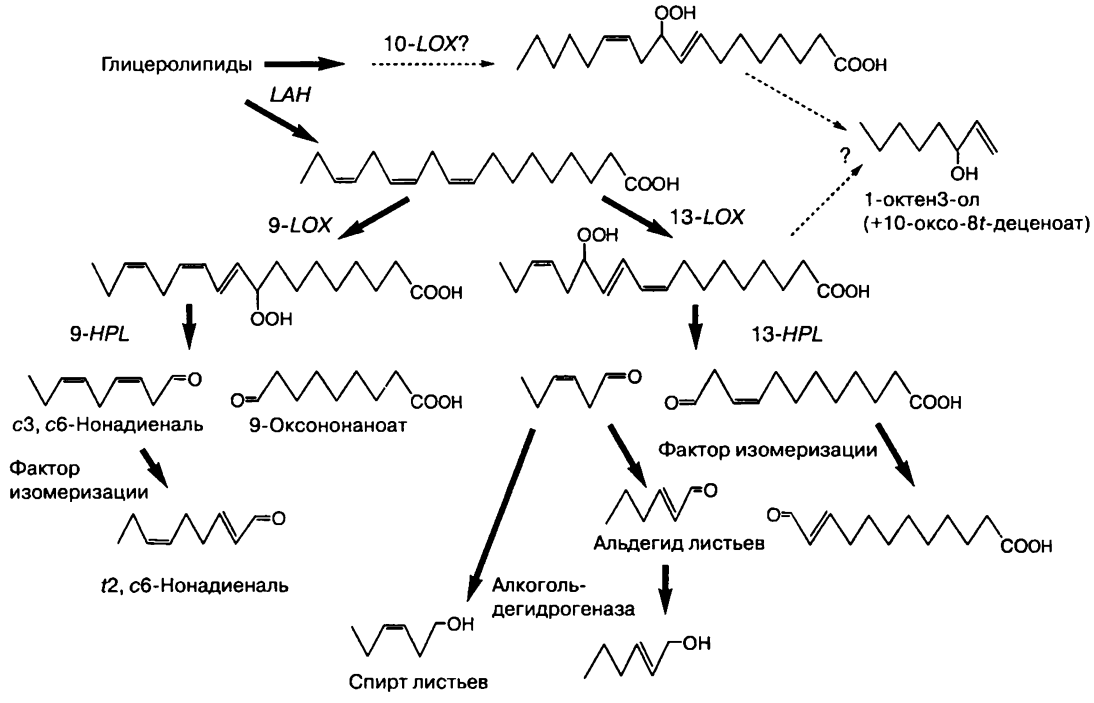


Рис. 6.48. Превращения жирных кислот при совместном действии липоксигеназы (*LOX*), гидропероксидлиазы (*HPL*) и вспомогательных ферментов, ведущие к образованию ароматических нот «зелени». По [12, 135]

торы, влияющие на биогенезис запаха, в частности, различия в содержании ферментов и соотношение выделяющихся под действием липидацилгидролазы линолевой и линоленовой кислот.

Превращения линоленовой кислоты показаны на рис. 6.48. В случае линолевой кислоты протекают те же реакции с образованием аналогичных продуктов с разным запахом; состав и соотношение получающихся продуктов реакции определяются различиями в селективности ферментов по отношению к конкретным жирным кислотам, а также природой вспомогательных ферментов. Хотя для огурцов, семян льна, пшеничных зародышей, ячменя и соевых бобов получены данные, свидетельствующие о наличии специфических изомеризующих ферментов [45, 135], изомеризация может быть в значительной мере неэнзиматической, и причина изомеризации остается не до конца ясной [12]. Эффект, приписывавшийся ранее гидропероксидизомеразе (сначала получившей код ЕС 5.3.99.1, но в 1992 г. исключенной из классификации ферментов), объясняется совместным действием гидропероксиддегидратазы (алленоксидсинтазы, ЕС 4.2.1.92) и алленоксидциклазы (ЕС 5.3.99.6). О действии алкогольдегидрогеназы известно мало — неясно, какая ее форма участвует в процессе, специфическая изоформа или базальная клеточная алкогольдегидрогеназа [12]. В любой ткани содержатся свои ароматические соединения, образование которых обусловлено метаболическими или ферментативными путями, влияющими на вкус и аромат пищевых продуктов (см. табл. 6.12).

Гидропероксидлиазы (цитохромы *CYP74B* и *CYP74C*) являются, по всей вероятности, тетрамерами с молекулярной массой мономерной единицы 55–60 кДа, мембраносвязанными (пластиды) в тканях [43]. Они отличаются от других цитохромов тем, что не требуют O_2 и *NAD(P)H* — вместо них эти цитохромы утилизируют гидропероксиды жирных кислот *LOOH* одновременно как субстраты и доноры кислорода с образованием новых связяй С–О. Они характеризуются высоким каталитическим «числом оборотов» (10^3/с) [49]. Неудивительно, что многие ингибиторы липоксигеназы (см. рис. 6.47) ингибируют и гидропероксидлиазу, поскольку оба фермента связывают цепи жирных кислот. Установлено, что в дополнение к четырем тетрапиррольным лигандам железо координируется с цистеином [43]. Ферменты перца, томатов и гуавы высокоспецифичны относительно 13-*LOOH* и входят в состав подсемейства *CYP74B*, тогда как ферменты огурца и дыни действуют и на 9-*LOOH*, и на 13-*LOOH*, и их относят к подсемейству *CYP74C*. Свойства других гидропероксидлиаз еще нуждаются в уточнении.

Особенно интересна ферментная система грибов, которая при диоксигенации линолевой и линоленовой кислот образует С10- и С8-фрагменты (см. табл. 6.12 и рис. 6.48). Сначала предполагалось присутствие 10-*LOX*, однако позднее было показано, что диоксигенация под действием липоксигеназы грибов происходит по С13 [63]. Вместе с тем в грибах образуется линолеат-изомер 10-*LOOH* [4]. Препараты белка из грибов могут расщеплять производные 10-*LOOH* с образованием С10-оксокислоты и 1-октен-3-ола. Характер действия фермента и причина образования летучих соединений из линолевой и линоленовой кислот в грибах остается неясной.

Механизм действия гидропероксидлиазы (и других членов семейства *CYP74*) изучался на примере фермента из гуавы. Была высказана гипотеза об образовании эпоксиаллильного радикала и затем гемиацеталя, распадающегося с образованием продуктов фрагментации (рис. 6.49) [49]. По-видимому, этот механизм характерен для всех гидропероксидлиаз — он аналогичен механизму действия цитохромов семейства P450*s*.

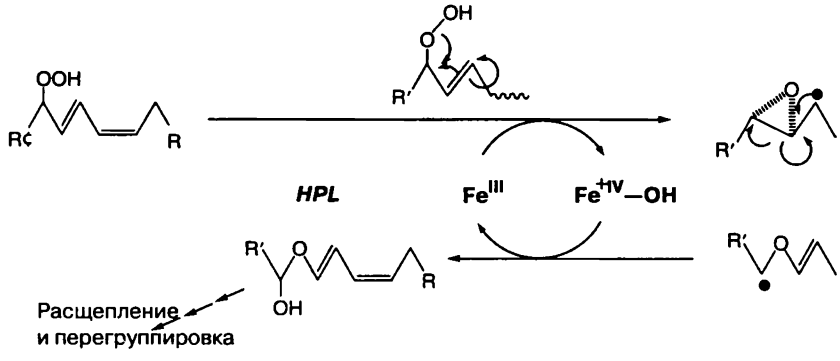


Рис. 6.49. Механизм действия гидропероксидлиазы. По [70

Исследования механизмов действия липоксигеназы и гидропероксидлиазы в генно-модифицированных овощах дали следующие противоречивые результаты. Внедрение в томаты Δ9-десатуразы и алкогольдегидрогеназы усилило запах, тогда как супрессия липоксигеназы и овер-экспрессия 9-гидропероксидлиазы эффекта не дали [72]. Для создания ароматических нот «зелени», обусловленных присутствием 6-С-альдегидов и спиртов, в промышленности в настоящее время используют высокоактивную 13-специфичную липоксигеназу и 13-*LOOH*-гидропероксидлиазу в сочетании с каким-либо недорогим источником линоленовой кислоты. Объем рынка подобных ароматизаторов оценивается в $40 млн в год.

6.5.3.3. Биогенез прочих видов аромата, обусловленных липидами

Образование ароматических эфиров в плодах, особенно в период их созревания, обусловлено действием алкогольацилтрансферазы (ЕС 2.3.1.84) [106]. Этот фермент присутствует в яблоках, землянике, бананах, дынях, оливках, а также в дрожжах и грибах. Он катализирует следующую реакцию:

$$\text{S-ацил-кофермент А} + \text{спирт} \leftrightarrow \text{Ацил-эфир} + \text{кофермент А–SH}. \quad (6.58)$$

В результате образуются ацетат- и бутаноат-эфиры метил- и этил-разветвленных, фенилэтил- или *n*-спиртов с числом атомов углерода от 2 до 8.

Механизм возникновения других обусловленных липидами ароматов иной. Считается, что медиаторами образования летучих эфиров являются липазы и при этом протекают обратимые реакции гидролиза. Доказательств такого действия липаз в плодах нет, однако эти реакции проходят при сбраживании дрожжами; слабый фруктовый запах может быть обусловлен присутствием ферментирующих микроорганизмов и вносит свой вклад в аромат зрелого сыра. Биосинтез терпеноидов в лекарственных травах и пряностях является сложным многостадийным процессом биосинтеза, где исходными фрагментами служат изопреновые единицы [106]. Липопротеинлипаза (*LPL*), содержащаяся в молоке (1–2 мг/л) [141], может вызвать «самопроизвольное» прогоркание (если молоко перед пастеризацией не было обработано должным образом).

6.5.3.4. Возникновение и контроль едкого аромата, а также других биологически обусловленных факторов

6.5.3.4.1. Превращение глюкозинолатов под действием мирозиназы

Растения семейства крестоцветных (капустных, *Brassicaceae*), особенно кочанная капуста, капуста брокколи, цветная капуста, репа, кормовая и брюссельская капуста, редис, горчица и васаби (японский хрен) известны своим острым вкусом [5, 75]. При разрушении растительной ткани создаются благоприятные условия для вступления в реакцию с разнообразными неароматическими глюкозинолатами фермента мирозиназы (ЕС 3.2.1.147, ранее — 3.2.3.1, тиоглюкозидглюкогидролаза). Мирозиназа содержится в специализированных клетках (идиобластах), называемых также «мирозиновыми». По соседству с ними находятся богатые серой S-клетки, в вакуолях которых содержатся глюкозинолаты (до 100 мМ) и аскорбат [5]. При разрушении такой клетки аскорбат переходит в раствор (1–2 мМ) и активирует фермент при его смешивании с глюкозинолатом. Мирозиназы гликозилированы на 10–20% и существуют в виде нескольких изоформ с молекулярной массой мономера 65–70 кДа, причем их структура стабилизирована тремя дисульфидными мостиками и ионом Zn^{2+} Они также могут существовать в форме гомоолигомеров или их комплексов с другими белками. Мирозиназы из разных источников характеризуются максимальной активностью при pH 4–8 и температуре 40–75 °С.

Мирозиназа принадлежит к семейству 1 гликозилгидролаз (см. раздел 6.3.2) и обладает двумя уникальными свойствами: она гидролизует β-*D*-тиоглюкозиды (но не *O*-гликозиды) и имеет только один из обычно двух каталитических остатков *ASP/GLU* [17]. В этом ферменте имеется гидрофобный связывающий «карман» (в ферменте из семян горчицы, например, это $PHE_{331,371,473}$, ILE_{257}, TYR_{330}), связывающий R-группы глюкозинолата, которые представляют собой в основном алк(ен)ильные цепи, в том числе разветвленные или содержащие в качестве заместителей S, S=O, кето- или гидроксильные группы [75]. Не-

которые аминокислотные остатки (GLU_{464}, $GLN39$, HIS_{141}, ASN_{186}) участвуют в образовании водородных связей с глюкозой, а TRP_{457} обеспечивает гидрофобную платформу для стекинга с пиранозным кольцом [17]. Остатки GLN_{409} и $ARG_{194',259}$ координируются с сульфатными группами субстрата, а GLU_{409} представляет собой карбоксилатный нуклеофил фермента, замещающий S-агликон («хорошую» отщепляемую группу) и участвующий в формировании фермент-глюкозного ковалентного интермедиата (рис. 6.50) [17, 18, 75]). Скоростьлимитирующей стадией процесса является высвобождение глюкозы; в других гликозилгидролазах для активации воды как нуклеофила используется второй консервативный карбоксилат (*GLU* или *ASP*). Некоторая дополнительная активация воды для замещения глюкозы (и сохранения β-конфигурации) может осуществляться за счет Н-связи с *GLN*187. Активацию мирозиназы аскорбиновой кислотой (увеличение *V*max в несколько сотен раз) в настоящее время объясняют ее действием как «внешнего» кофактора [18]. Аскорбат присоединяется к ферменту после высвобождения агликона (они «делят» один и тот участок связывания); по-видимому, аскорбат активирует нуклеофильную воду, замещающую глюкозу. Расстояние между GLU_{409} и аскорбатом составляет примерно 7,0 Å, что больше, чем расстояние между каталитическими *GLU/ASP* (4,5 Å) у типичной удерживающей гликозилгидролазы. Очевидно, что это может быть обусловлено большими размерами аскорбатного остатка. В наибольшей степени активация аскорбатом наблюдается при его концентрации 0,5–1,5 мМ, а при избытке аскорбат конкурирует с глюкозинолатом и тормозит ферментативный цикл.

Превращения гидролизованных глюкозинолатов зависят также от состава среды и их структуры (некоторые примеры приведены на рис. 6.51) [73]. При обычных для тканей овощей значениях pH образуются производные изотиоцианата (см. рис. 6.50). В присутствии Fe^{2+} и эпитиоспецифичного (неферментного) белка вместо изотиоцианатов могут накапливаться эпитионитрилы. Продукты гидролиза 2-гидроксиалк(ен)ил-глюкозинолатов (например, прогоитрин) как изотиоцианаты нестабильны и перегруппировываются в оксазолидин-2-тионы.

В кислой среде в присутствии Fe^{2+} и цистеина могут образовываться нитрилы, а в нейтральной и слабощелочной — индол (например, глюкобрассицин); бензил-глюкозинолаты при расщеплении дают соответствующие спирты и цианат, а аллил- (синигрин) и метилтиопроизводные (дегидроэруцин) образуют

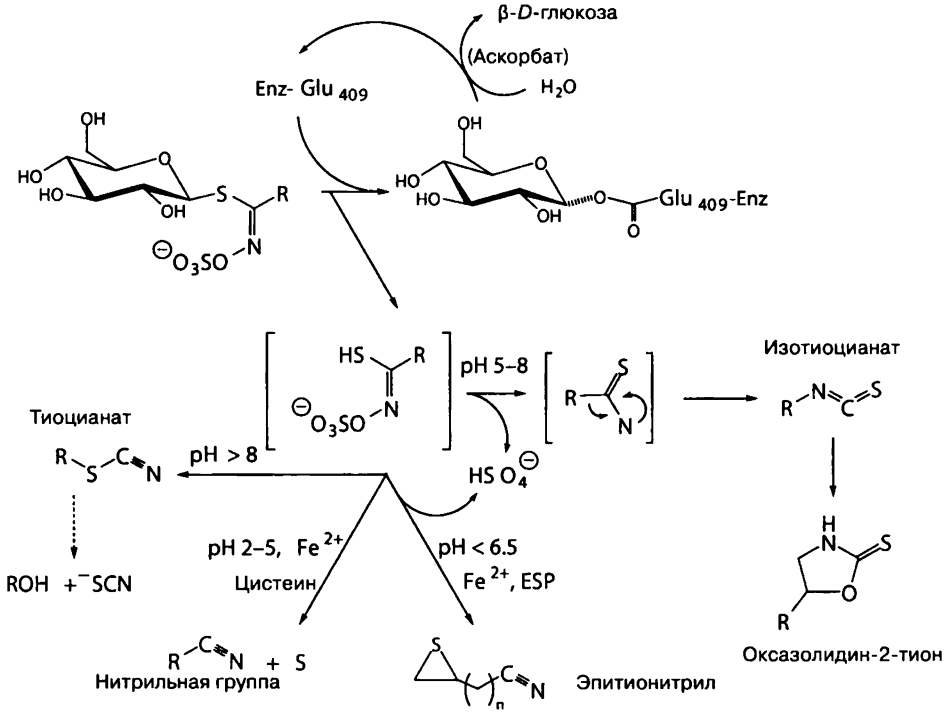
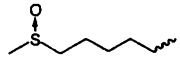
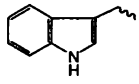
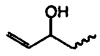
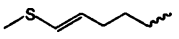
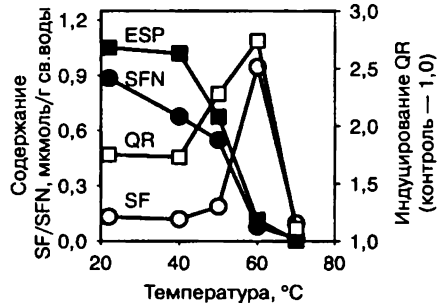
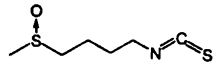
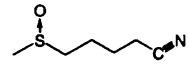


Рис. 6.50. Механизм действия мирозиназы. По [17, 18, 75]

Глюкозинолатные R-группы	Тривиальное наименование	Источник с высоким содержанием данного соединения
	Синигрин	Горчица, кочанная капуста
	Глюкорафанин	Капуста брокколи
	Глюкобрассицин	Кочанная капуста
	Прогоитрин	Брюссельская капуста
	Дигидроэруцин	Хрен, редис







С

Рис. 6.51. Некоторые глюкозинолаты и влияние мирозиназы на образование конечных продуктов реакции. По [73]: *ESP* — эпитиоспецифичный белок; *QR* — хинонредуктаза, канцерогендетоксицирующий фермент животных клеток; *SF* — сульфорафан; *SFN* — сульфорафан-нитрил

тиоцианаты. Некоторые из этих продуктов обладают антинутритивным действием — например, цианаты негативно влияют на усвояемость йода, 2-гидрокси-3-бутенил-глюкозинолаты (прогоитрин) ассоциируются с возникновением гипотироидизма, а нитрилы могут быть токсичными. Несмотря на эти отрицательные моменты, в настоящее время можно говорить о явной связи между потреблением овощей семейства крестоцветных со снижением риска онкологических заболеваний, причем в основном их антиканцерогенный эффект обусловлен присутствием глюкозинолатов и продуктов их превращений.

Одним из наиболее мощных пищевых антиканцерогенов является сульфорафан — изотиоцианатное производное, образующееся в капусте брокколи из глюкорафанина (см. главу 12). Однако в большей степени, чем сульфорафан, в брокколи образуется сульфорафан-нитрил, антиканцероген, на несколько порядков более слабый, чем его изотиоцианатная форма [73]. Помимо способности образовывать эпитионитрилы, эпитиоспецифичный белок, по-видимому, участвует в образовании нитрилов из алк(ен)ил-глюкозинолатов в других видах растений семейства *Brassica*, хотя некоторыми учеными это подвергается сомнению. Для снижения содержания сульфорафан-нитрила и повышения содержания сульфорафана в соцветиях брокколи использовали тепловую обработку (см. рис. 6.51). Щадящее нагревание до 60 °С и выдерживание при этой температуре в течение 10–20 мин сохраняет активность мирозиназы и подавляет активность эпитиоспецичного белка. Такая дезактивация способствует изменению соотношения сульфорафан-нитрила и сульфорафана в пользу последнего (с 10 1 до почти 1 10), так что этот способ дает возможность увеличить содержание в капусте брокколи сильного антиканцерогенного соединения.

6.5.3.4.2. Аллиназы и родственные им ферменты

Аллиназы (ЕС 4.4.1.4, аллиинлиазы) являются ароматобразующими ферментами, присутствующими в растениях рода *Allium* — в репчатом луке, луке-порее, луке-резанце, чесноке — а также в капусте и некоторых грибах [141]. Строение активного участка и механизм действия аллиназы мы уже рассматривали в разделе, посвященном пиридоксаль-фосфатным ферментам. Аллиназа участвует в β-лизисе небелковых производных аминокислот — S-алк(ен)ил-*L*-цистеинсульфоксидов (*ACSO*) (см. рис. 6.5). Непосредственные продукты реакции — сульфеновые кислоты (R–SOH) — самопроизвольно конденсируются с образованием тиосульфинатов. В репчатом луке большая часть 1-пропенилсульфеновой кислоты перегруппировывается в пропантиаль-S-оксид, называемый также лакриматорным (слезоточивым) фактором (рис. 6.52) [114,141]. Условием для протекания этой реакции является разрушение ткани, поскольку *ACSO* находятся в цитозоле, а фермент — в вакуолях. Селективность большинства аллиназ относительно S-алк(ен)ил-*L*-цистеинсульфоксидам одинакова и убывает в следующем порядке:

ненасыщенные (1-пропенил- и 2-пропенил-) > пропил- > метил-производные.

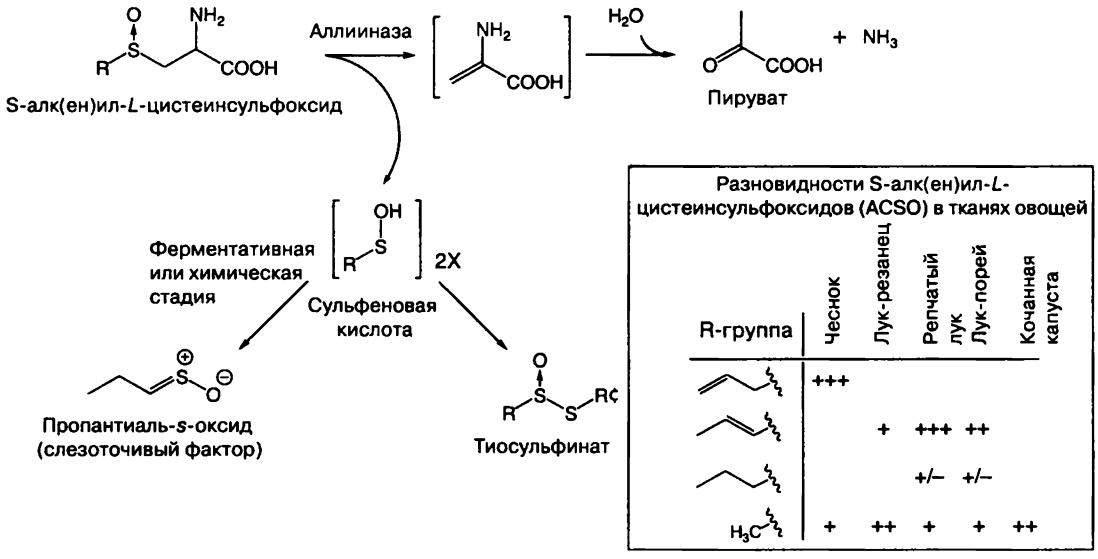


Рис. 6.52. Механизм действия аллиназы и разновидности S-алк(ен)ил-L-цистеинсульфоксидов (*ACSO*) в тканях овощей. По [114, 141]

Отношение реакционной способности аллиназ применительно к указанным сульфоксидам ($Vmax/K_M$) примерно равно 10 2 1 [114] (средние значения по опубликованным данным). Следовательно, состав продуктов реакции и характерный запах тканей растений рода *Allium* зависят прежде всего от относительного содержания S-алк(ен)ил-*L*-цистеинсульфоксидов (рис. 6.52), а не от свойств видоспецифичных аллиназ.

Аллиназа гликозилирована, существует в нескольких изоформах и может быть олигомерной с молекулярной массой мономера 48–54 кДа. Оптимальный диапазон значений pH для разных аллиназ неодинаков: так, для ферментов репчатого лука, лука-порея, капусты брокколи и грибов он составляет 7–8, а для ферментов чеснока и родственных ему растений — 5,5–6,5. Это различие имеет не слишком большое практическое значение, поскольку все аллиназы довольно активны и при pH 4,5–8,5 [60,141]. Они составляют соответственно 6 и 10% от белка тканей лука и чеснока, и особенно активны в поврежденных тканях, pH которых составляет 5,2–6,0. При комнатной температуре в поврежденных клетках репчатого лука за 1 мин в сероорганические соединения превращается от 70 до 90% *ACSO*, а за час — 100% [65, 101].

Помимо образования спефического запаха при повреждении тканей на свойства пищевых продуктов влияют и другие реакции аллиназ. Нарезанные консервированные или маринованные репчатый лук и чеснок могут менять цвет и приобретать малиново-красный (лук) и сине-зеленый (чеснок) оттенки. Основную роль в таком изменении цвета играют 1-пропенил-S(O)S-R-тиосульфинаты [61]. Консервированный чеснок при хранении в холодильнике может аккумулировать в низких концентрациях 1-пропенил-*ACSO* и аллил-*ACSO*, которые способствуют изменению цвета нарезанных овощей.

Обработку растительных тканей следует проводить так, чтобы максимально сохранить активность аллиназ. Как мы уже отмечали, замораживание способствует сохранению активности аллиназ тогда, когда размораживание проводят достаточно быстро, не допуская чрезмерной денатурации белков [136]. Для сохранения активности аллиназ используют добавки криопротекторов — глицерина и экзогенного пиридоксаль-фосфата. При сублимационной сушке сохраняется около 75% исходной активности аллиназ, а при низкотемпературной (при 55 °C) сушке — около 50% [68]. При производстве БАДов на основе растений рода *Allium*, когда требуется сохранить достаточный уровень остаточной активности аллиназы, чтобы выделять тиосульфинаты *in situ* в кишечнике человека, подходят оба эти метода. Для этого используются кишечно-растворимые капсулы или таблетки, защитный слой которых предохраняет фермент от дезактивирующего действия желудочного сока и других ферментов. В отличие от таблетированных форм в приправах на основе лука или чеснока, подвергаемых более жесткой тепловой обработке, сохраняется лишь около 5% остаточной активности аллиназы.

В растительных тканях представителей рода *Allium* некоторые ароматобразующие предшественники *ACSO* могут существовать в виде γ-глутамил-*ACSO*-пептидов, причем эти пептид-связанные S-алк(ен)ил-*L*-цистеинсульфоксиды субстратами для аллииназы не являются. Транспептидаза (ЕС 2.3.2.2) катализирует перенос γ-глутамильной группы от *ACSO* на другую аминокислоту с выделением свободного *ACSO*, с которым затем может вступить во взаимодействие аллииназа, что приведет к усилению запаха. Особенно высока активность транспептидазы луковиц и проросших семян растений рода *Allium*; приготовленные из них экстракты представляют собой дополнительный источник предшественников вкуса и аромата для различных блюд. Чаще всего используют сухие экстракты, разведение которых водой позволяет проявить ферментативную активность и обеспечить усиление вкуса и аромата в нужное время.

В растениях рода *Allium*, семейства крестоцветных и в бобовых культурах, а также в грибах и некоторых бактериях присутствуют цистинлиазы (ЕС 4.4.1.8), известные также под названием β-цистатионазы, хотя многие растительные ферменты не обладают двумя видами активности [141]. Цистинлиазы представляют собой пиридоксалевые ферменты, катализирующие β-элиминирование цистина и образование тиоцистеина (*CYS-SSH*), что способствует усилению сернистого запаха. В капусте брокколи этот фермент существует во многих изоформах, которые растворимы и имеют pH-оптимум 8–9. Цистинлиазы из разных источников могут также реагировать с *ACSO*, однако аллииназы с цистином не реагируют. Сходный пиридоксалевый фермент метионин-γ-лиаза (ЕС 4.4.1.11) дает метантиол (CH_3SH), и реакция его образования участвует в формировании аромата некоторых сыров, придаваемого, вероятно, заквасочными или дополнительными культурами.

6.5.3.4.3. Прочие ароматобразующие ферменты

Усилению сладости продуктов на основе батата (сладкого картофеля), приготовленных в домашних условиях, — консервов, хлопьев и пюре способствует повышение содержания мальтозы в присутствии эндогенных β-амилаз [125]. Для некоторых сортов батата с высоким содержанием мальтозы характерна повышенная активность и термостойкость β-амилазы. При медленном нагревании с 70 до 90 °C в течение двух часов достигается высокая степень клейстеризации крахмала и создаются условия для длительного воздействия на него β-амилазы, что приводит почти к пятикратному повышению содержания мальтозы по сравнению со средне- и низкомальтозными сортами батата.

6.5.4. Ферменты, влияющие на текстуру пищевых продуктов

Изменения текстурных и реологических свойств пищевых продуктов могут быть вызваны ферментами, действующими на компоненты разной молекулярной массы. Примеры модификации текстуры и реологических свойств мы уже приводили при описании применения экзогенных ферментов для разжижения и создания тонких крахмальных суспензий, для снижения вязкости и мутности фруктовых соков, для гидролиза и гелеобразования белков, а также для изменения вязкоупругих свойств теста и др. В этом разделе мы рассмотрим способы контроля влияния эндогенных ферментов на качество пищевых продуктов.

6.5.4.1. Контроль ферментов, модифицирующих полисахариды

Возможно, наиболее старыми, но по-прежнему эффективными методами контроля эндогенной активности фермента относительно углеводов являются «горячий» и «холодный» процессы расщепления углеводов в производстве пищевых продуктов на основе томатов, хотя эти термины не совсем точны. «Горячий» процесс представляет собой быстрое нагревание ткани томата до более чем 85–90 °C, проводимое для инактивации эндогенных полигалактуроназы и пектинметилэстеразы. При этом сохраняется пектин, поддерживается вязкость и консистенция, а также стабилизируется мутность томатного сока. В «холодном» процессе используются температуры ниже 70 °C, при которых указанные ферменты термически «активированы», и в результате пектин деполимеризуется и, соответственно, снижается вязкость, а деэтерификация пектина приводит к утрате мутью стабильности и к разделению жидкой сыворотки и сухих веществ. «Холодный» процесс может улучшать вкус (возможно, за счет большего соотношения липоксигеназ/гидропероксидлиаз-опосредованного образования аромата), однако окончательно это еще не установлено. И «холодный», и «горячий» процессы используются в производстве соков и других пищевых

продуктов на основе плодоовощной продукции Выбор того или иного процесса зависит от того, являются ли эти продукты конечными или лишь ингредиентами для производства других. Томатные пасты лучше производить «горячим» способом, что сохраняет их консистенцию и вязкость. Высокотемпературные процессы используются также в производстве апельсинового и других соков, поскольку они позволяют поддерживать требуемую мутность.

Для контроля пектинолитических ферментов и текстуры пищевых продуктов используют также умеренные режимы тепловой обработки (низкотемпературное бланширование), позволяющие уменьшить размягчение ткани при последующей тепловой обработке целых или нарезанных овощей и фруктов. Тепловую обработку при 55–80 °С проводят для стимулирования действия пектинметилэстеразы и «упрочнения» ткани за счет адгезии клеточной стенки и компонентов средней ламеллы. После гидролитического отщепления метоксигрупп пектина образуются карбоксилатные группы, способные образовывать кальциевые мостики между соседними пектиновыми полимерами (см. модель структуры формованных лотков для яиц из бумажной массы, описанную в главе 3). Это делает текстуру более прочной и препятствует дезинтеграции частей ткани («расползания») в ходе последующей тепловой обработки, например, стерилизации в автоклаве.

Одним из первых продуктов, для которого применение описанных выше способов дало положительный результат, стал картофель [8]. Было установлено, что предварительная тепловая обработка (до варки) при температуре 60–70 °С в течение 30–120 мин препятствует чрезмерному размягчению и почти полностью устраняет «расползание» тканей (рис. 6.53) [8]. Для «расползания» ткани и создания условий для миграции катионов, а также для активации пектинметилэстеразы необходима температура не ниже 55–60 °С; при более высоких температурах фермент будет слишком быстро дезактивироваться. Таким образом, кусочки картофеля, выдержанные при 25 °С и затем сваренные, разваривались на 80–100% и были более мягкими, чем кусочки, выдержанные до варки при температуре 60–70 °С. Активация тканевой пектинметилэстеразы была зарегистрирована по увеличившемуся содержанию MeOH и остаточной ферментативной активности при 50–70 °С. Этот способ доказал свою эффективность для батата, лущильной фасоли, огурцов (используемых для маринования), моркови, перца и томатов; в некоторых случаях «упрочняющий» эффект усиливался при добавлении Ca^{2+}-содержащих рассолов. Косвенный эффект усиления активности пектинметилэстеразы состоит в снижении количества субстрата, взаимодействующего с пектинлиазами (которые распознают метил-галактуронатные остатки в активном центре, см. раздел 6.3.2.3), что снижает вероятность реакций β-элиминирования [132].

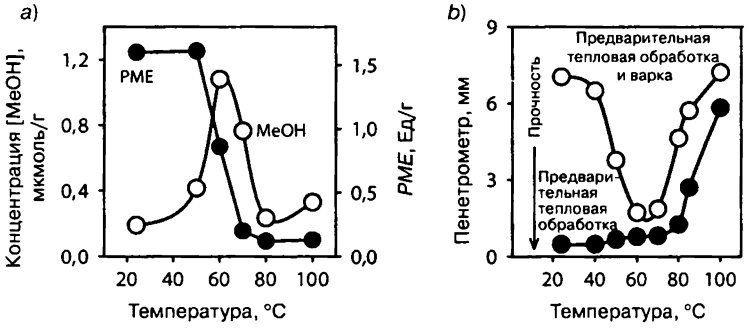


Рис. 6.53. Влияние температуры на активность эндогенной пектинметилэстеразы (*PME*) в клубнях картофеля: *a* — содержание остаточного MeOH и *PME* в тканях, предварительно подвергнутых тепловой обработке в течение двух часов; *b* — упрочнение ткани после стадии предварительного нагревания (черные кружки) или после предварительного нагревания и последующей варки (белые кружки). По [8]

6.5.4.2. Контроль ферментов, модифицирующих белки

Главным фактором, определяющим тендеризацию мяса при созревании, является расщепление белков. К эндогенным мышечным протеазам, влияющим на тендеризацию, относятся катепсины, высвобождающиеся из лизосом, и/или калпаины. Помимо температуры, времени созревания и темпов снижения pH после убоя известны и другие факторы эндогенного протеолиза. Одним из них, вызвавшим значительный интерес у производственников, является постмортальная электростимуляция туш, приводящая к тендеризации мяса за счет снижения холодового сокращения мышечных тканей, разрушения их структурных элементов и стимулирования эндогенных протеаз (частично из-за выделения Ca^{2+} в саркоплазму) [57]. Мышечная калпаиновая система (активируемые ионами Ca^{2+} цистеиновые протеазы) участвует в раннем

послеубойном гидролизе, обусловливающем тендеризацию, однако мышечные протеазы являются лишь одним из нескольких факторов, влияющих на твердость или мягкость мяса (см. главу 16).

Эндогенные протеазы могут снижать качество вырабатываемых из рыбного сырья гелей (суримиподобные продукты). Протеазы в образующих слабый гель мышечных тканях рыб чувствительны к реагентам, взаимодействующим с *CYS*-аминокислотными остатками. Эффективный способ решения это проблемы — внесение «цистатиноподобных» ингибиторов протеаз. Такие ингибиторы присутствуют в бычьей плазме крови, белке куриных яиц, картофеле и могут использоваться для подавления активности эндогенных протеаз в продуктах из сурими и улучшения качества гелей.

Эндогенные протеазы присутствуют также в молоке, и основной из них является получаемый из крови плазмин. Плазмин (ЕС 3.4.21.7) представляет собой сериновую протеазу массой 81 кДа, оптимальные условия реакций — pH 7,5–8,0 и температура 37 °С [141]. Стабилен этот фермент в широком диапазоне pH (4–9), а при 5 °С он сохраняет 20% максимальной активности. Благодаря многочисленным дисульфидным связям плазмин не разрушается при пастеризации и не теряет активности даже после УВТ-обработки. В молоке этот фермент присутствует в основном в зимогенной форме (то есть в виде плазминогена), которая под действием активаторов, в том числе других сериновых протеаз, переходит в активную форму. И плазмин(оген), и его активаторы связаны с мицеллами казеина. Ингибиторы и активаторы плазмина локализованы в сывороточной фазе и предотвращают спонтанные активацию и протеолиз в свежем и пастеризованном молоке. В производстве сыра плазмин остается связанным с мицеллами казеина, что способствует протеолизу в ходе созревания главным образом $\alpha_s 2$- и β-казеинов. В сыре из ультрафильтрованного молока плазмин менее активен, поскольку значительное количество СВ сыворотки (источника ингибиторов плазмина) сохраняется в сгустке. Благодаря своей высокой термостойкости плазмин вносит основной вклад в процессы протеолиза сыра, подвергаемого высокотемпературной обработке, так как при этом его ингибиторы инактивируются. Плазмин также участвует в процессах гелеобразования УВТ-молока и взбитых сливок.

6.5.4.3. Исправление дефектов текстуры пищевых продуктов с помощью контроля активности ферментов небольшими молекулами

В финиках при достаточно высоком отношении сахарозы и редуцирующих сахаров (2 1) происходит кристаллизация сахарозы и формируется твердая «песчанистая» текстура [118] — дефект, получивший название «сахарной стенки» (для сравнения: в сушеных финиках премиум-класса это соотношение составляет 1,1–1,6 : 1). Было показано, что в финиках, склонных к образованию «сахарной стенки», мало эндогенной инвертазы. Для устранения данного дефекта некачественные финики подвергали вакуумно-инфузионной обработке 0,01–0,10%-ным раствором промышленно выпускаемой инвертазы, а для сравнения образец обрабатывали таким же количеством чистой воды. После обработки финики с содержанием влаги 20–22% помещали в герметичные капсулы и хранили в течение 60 сут при температуре около 27 °С. Как и следовало ожидать, в финиках, подвергнутах ферментной обработке, проходила «инверсия» 54–76% сахарозы, и ее отношение к редуцирующим сахарам понизилось до 0,22–0.44 1. Неожиданным оказалось то, что даже в финиках, обработанных водой без инвертазы, проходила инверсия сахарозы (до 53%), а отношение сахароза : редуцирующие сахара достигало 0,56 : 1. Через 60 сут в обоих образцах дефект «сахарной стенки» не обнаруживался. Эти результаты свидетельствуют, что активировать эндогенные ферменты можно путем простого добавления воды. Через 60 сут все финики высушивали до содержания влаги 16–18% и выдерживали еще месяц. В финиках, обработанных только водой, опять образовалась «сахарная стенка», тогда как в финиках, подвергнутых ферментной обработке, этот дефект был выявлен лишь у 0–10% фиников, и его встречаемость была обратно пропорциональна дозе внесенного фермента. Таким образом, для полного устранения указанного дефекта можно проводить обработку фиников экзогенной инвертазой.

Рассмотрим также действие фермента *TMAO*-деметилазы (ЕС 4.1.2.32), катализирующей следующую реакцию в мышечной ткани, особенно характерную для рыб семейства тресковых:

$$(CH_3)_3N \rightarrow O \rightarrow (CH_3)_2NH + HCHO \qquad (6.59)$$

Продукт этой реакции, формальдегид (HCHO), вызывает сшивку белков, что при хранении филе или рыбных блоков в замороженном состоянии делает мышечную ткань жесткой и волокнистой. Разрушение

мышечной ткани при замораживании или измельчении способствует ферментативной реакции, поскольку содержимое отдельных фрагментов ткани декомпартментируется (содержание *TMAO* в мышечной ткани может превышать 100 мМ). *TMAO*-деметилаза в животных и растительных тканях встречается редко, однако характерна для некоторых бактерий. По-видимому, в мышечной ткани и органах рыб этот фермент ассоциирован с клеточными мембранами, однако он может солюбилизироваться Показано, что реакционная способность изолированного мембранного фермента определяется двумя «кофакторными» или косубстратными системами [87]. Цианидчувствительной системе требуется *NAD(P)H* и *FMN*, и функционирует она только анаэробно. Другая система нечувствительна к цианиду и включает Fe^{2+}, аскорбат и/или цистеин, причем ее активность не зависит от давления кислорода и составляет лишь 20% от активности системы *NAD(P)H/FMN*.

При промышленной переработке рыбы важно предотвратить реакцию (6.59) в замороженных рыбных блоках (массой около 7 кг), которые затем разделяют на части; до замораживания рекомендуется проводить «созревание» во льду [100]. Скорость образования *TMAO* в рыбных блоках из свежего филе по мере создания все более анаэробных условий прогрессивно возрастает (табл. 6.13) [100], однако этот эффект толщины блока уже через сутки хранения быстро снижается и через 10 сут хранения полностью исчезает. Таким образом, способность к анаэробной ферментативной реакции при длительном хранении (созревании) снижается практически до нуля и объясняется, по-видимому, разложением необходимых для анаэробной реакции кофакторов *NAD(P)H* и *FMN* и невозможностью их восполнения [90]. Этот эффект усиливается в присутствии KCN, ингибитора гемопротеинов, снижающего скорость образования *TMAO* в свежей рыбе до нормальной по всей толщине блока. Ингибирование ферментативной реакции цианидом делает возможным метаболизм только по не зависящему от O_2 пути. Результаты данного исследования свидетельствуют, что в мышечной ткани рыб наиболее активной является анаэробная кофакторная система, причем основную «кофакторная» систему, поддерживающую активность фермента, можно нейтрализовать простым хранением рыбы во льду перед замораживанием. Этот пример показывает, что контролировать активность фермента в пищевых продуктах можно путем влияния на кофакторы, активаторы или субстрат. Другой подход к решению проблем текстуры рыбных изделий был предложен рыбаками из штата Мэн, которые перед замораживанием замачивают рыбное филе в морской воде [66]. При этом часть низкомолекулярных ингредиентов, включая субстрат и кофакторы, вымываются из мышечной ткани с тканевым соком под действием осмотических сил. Последующее замораживание примерно на 80% снижает скорость образования и количество образующегося формальдегида и уменьшает степень повреждения текстуры.

Таблица 6.13

Контроль активности *TMAO*-деметилазы в замороженной рыбе. По [100]

Расположение в толщине блока, мм от поверхности	Начальная скорость реакции, мкмоль HCHO/100 г в сутки, после хранения во льду в течение:			
	0 сут	1 сут	10 сут	0 дней + KCN
2	10	7,0	2,4	3,9
6	20	8,5	2,4	3,5
10	24	11	2,3	2,1
18	25	12	2,1	4,0

Примечание: Концентрация KCN —2 мМ, рыбные блоки (160×100×25 мм) хранились при —10 °С.

Дополнительная литература

Aehle W. Enzymes in Industry. Production and Applications. — 2nd ed. — Weinheim: Wiley-VCH, 2004. — 484 p.

Copeland R. A. Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Function, Mechanism, and Data Analysis. — 2nd ed. — NY: John Wiley & Sons, 2000. — 397 p.

Fersht A. Enzyme Structure and Mechanism. — 2nd ed. — NY: W. H. Freeman & Company, 1985. — 475 p.

Godfrey T., West S. (eds) Industrial Enzymology. — 2nd ed. — NY: Stockton Press, 1996. — 609 p.

Palmer T. Understanding Enzymes. — 4th ed. — NY: Prentice Hall/Ellis Horwood, 1995. — 398 p.

Segel I. H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. — NY: John Wiley &

Sons, Inc., 1975. — 957 p.
Sinnott M. (ed.) Comprehensive Biological Catalysis. A Mechanistic Reference. — Vol. I–IV. — San Diego, CA: Academic Press, 1998.
Stauffer C. E. Enzyme Assays for Food Scientists. — NY: Van Norstrand Reinhold, 1989. — 317 p.
Tucker G. A., Woods L. F. J. (eds) Enzymes in Food Processing. — 2nd ed. — NY: Blackie, 1995. — 319 p.
Whitehurst R. J., Law B.A. (eds). Enzymes in Food Technology. — 2nd ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2002. — 255 p.
Whitaker J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences. — 2nd ed. — NY: Marcel Dekker, 1994. — 625 p.
Whitaker J. R., Voragen A.G. J. Wong D. W. S. (eds). Handbook of Food Enzymology. — NY: Marcel Dekker, 2003. — 1108 p.

Литература

1. Acker L., Kaiser H. Ueber den einfluss der feuchtigkeit auf den ablauf enzymatischer reaktionen in wasserarmen lebensmitteln. II. *Mitteilung* // *Lebensm. Unters. Forsch.*, 1959, 110, S. 349–356.
2. Ader U., Andersch P., Berger M. et al. Screening techniques for lipase catalyst selection // *Methods in Enzymology* / Rubin B. Dennis E. A. (eds). — Vol. 286. — NY: Academic Press, , 1997. — P. 351–387. — (Lipases, Part B. Enzyme Characterization and Utilization).
3. Aehle W. *Enzymes in Industry. Production and Applications.* — 2nd ed. — Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2004.
4. Akakabe Y., Matsui K., Kajiwara T. Stereochemical correlation between 10-hydroperoxyoctadecadienoic acid and l-octen-3-ol in *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake* mushrooms // *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69, p. 1539–1544.
5. Andreasson E., Jørgensen L. B. Localization of plant myrosinases and glucosinolates // *Recent Advances in Phytochemistry — Vol.37. Integrative Phytochemistry: From Ethnobotany to Molecular Ecology* / Romero J. T. (ed.) — Oxford, UK: Elsevier Scientific Ltd., 2003. — P. 79–99.
6. Anthon G. E., Sekine Y. Watanabe N., Barrett D. M. Thermal inactivation of pectin methyl esterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice // *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 6153–6159.
7. Axelrod B., Cheesebrough T. M., Laakso S. Lipoxygenase from soybeans // *Methods in Enzymology* / Lowenstein, J. M. (ed.). — Vol. 71, *Lipids.* — NY: Academic Press, 1981. — P. 441–451.
8. Bartolome L. G., Hoff J. E. Firming of potatoes: biochemical effects of preheating // *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20, p. 266–270.
9. Baer J., Martinez-Costa O. H., Aragon J. J. Regulation of phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme studied by stopped-flow measurements // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1990, 167, p. 1214–1220.
10. Bengtsson B., Bosund I. Lipid hydrolysis in unblanched frozen peas (*Pisum sativum*) // *J. Food Sci.*, 1966, 31, p. 474–481.
11. Benen J. A. E., Kester H. C. M., Armand S., Sanchez-Torres P., Parenicova L., Pages S. et al. Structure-function relationships in polygalacturonases: a site-directed mutagenesis approach // *Recent Advances in Carbohydrate Engineering* / Gilbert H. J., Davies G. J., Henrissat B., Svensson B. (eds). — Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1999. — P. 99–106.
12. Blee E. Phytooxylipins and plant defense reactions // *Prog. Lipid Res.*, 1998, 37, p. 33–72.
13. Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase // *Science,* 1993, 260, p. 1482–1486.
14. Brash A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate // *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, p. 23679–23682.
15. Broadbent J. R., Steele J. L. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria and their influence on bitterness in bacterial-ripened cheeses // *Flavor of Dairy Products* / Caldwaller K. R., Drake M. A., McGorrin R. J. (eds.). — Washington, DC: American Chemical Society, 2007. — (Symposium series)
16. Buccholz K., Kasche V., Bornscheuer U. T. *Biocatalysis and Enzyme Technology.* — Weinhein, Germany: Wiley-VCH, 2005.
17. Burmeister W. P., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S., Henrissat B. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provides insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glucosidase // *Structure,* 1997, 5, p. 663–675.
18. Burmeister W. P., Cottaz S., Rollin P., Vasella A., Henrissat B. High resolution x-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base // *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, p. 39385–39393.
19. Cao E., Chen Y., Cui Z., Foster P. R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 832, p. 684–690.
20. Carter P., Wells J. A. Dissecting the catalytic triad of a serine protease // *Nature,* 1988, 332, p. 564–568.
21. Carter P., Wells J. A. Functional interaction among catalytic residues in subtilisin BPN' // *Prot. Struct. Func. Genet.*, 1990, 7, p. 335–342.
22. Casey R., Hughes R. K. Recombinant lipoxygenase and oxylipn metabolism in relation to food quality // *Food Biotechnol.*, 2004, 18, p. 135–170.
23. Champion D., Blond G., Le Meste M., Stimatos D. Reaction rate modeling in cryoconcentrated solutions: alkaline phosphatase catalyzed DNPP hydrolysis // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 4942–4947.
24. Chen Y.-H., Aull J. L., Bell L. N. Invertase storage stability and sucrose hydrolysis in solids as affected by water activity and glass transition // *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p. 504–509.

25. Chipman D. M., Sharon N. Mechanism of lysozyme action // *Science,* 1969, 165, p. 454–465.
26. Christophersen C., Otzen D. E., Norman B. E., Christensen S., Schaefer T. Enzymatic characterisation of Novamyl®, a thermostable α-amylase // *Starch/Starke,* 1998, 50, p. 39–45.
27. Coffa G., Brash A. R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation // *Proc. Natl Acad. Sci.* (USA), 2004, 101, p. 15579–15584.
28. Copeland R. A. Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Function, Mechanism, and Data Analysis. — 2nd ed. — NY: John Wiley & Sons, 2000.
29. Cornish-Bowden A. Why is uncompetitive inhibition so rare? // *FEBS Lett.,* 1986, 203, p. 3–6.
30. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics* // London, UK: Portland Press Ltd., 1995.
31. Cumbee B., Hildebrand D. F., Addo K. Soybean flour lipoxygenase isozyme's effects on wheat flour dough: rheological and breadmaking properties // *J. Food Sci.,* 1997, 62, p. 281–283, 294.
32. Dao-Pin S., Liao D.-I., Remington S. J. Electrostatic fields in the active sites of lysozyme // *Proc. Natl Acad. Sci.* (USA), 1989, 86, p. 5361–5365.
33. Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A. M. et al. X-ray structure of Novamyl, the five-domain „maltogenic" α-amylase from *Bacillus stearothermophilus:* maltose and acarbose complexes at 1,7 Å resolution // *Biochemistry,* 1999, 38, p. 8385–8392.
34. Davies G. J., Wilson K. S., Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases // *Biochem. J.,* 1997, 321, p. 557–559.
35. De Jong G. A. H., Koppelman S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications // *J. Food Sci.,* 2002, 67, p. 2798–2806.
36. Drapon R. Modalities of enzyme activities in low moisture media // *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice* / Mathlouthi M. (ed.). — NY: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. — P. 181–198.
37. Dunford M. B. *Heme Peroxidases.* — NY: John Wiley & Sons, 1999. — 507 p.
38. Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. C. Catechol oxidase — structure and activity // *Curr. Opin. Struct. Biol.,* 1999, 9, p. 677–683.
39. Fennema O. Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems // *Water Relations in Foods* / Duckworth R. (ed.). — NY: Academic Press, 1975. — P. 397–413.
40. Fennema O., Sung J. C. Lipoxygenase-catalyzed oxidation of linoleic acid at subfreezing temperature // *Cryobiology,* 1980, 17, p. 500–507.
41. Fersht A. *Enzyme Structure and Mechanism.* — 2nd ed. — NY: W. H. Freeman & Company, 1985.
42. Fishbein W. N., Winkert J. W. Parameters of biological freezing damage in simple solutions: catalase. I. The characteristic pattern of intracellular freezing damage exhibited in a membraneless system // *Cryobiology,* 1977, 14, p. 389–398.
43. Fuessner I., Wasternack C. The lipoxygenase pathway // *Annu. Rev. Plant Biol.,* 2002, 53, p. 275–297.
44. Fukagawa Y., Sakamoto M., Ishikura T. Micro-computer analysis of enzyme-catalyzed reactions by the Michaelis-Menten equation // *Agric. Biol. Chem.,* 1981, 49, p. 835–837.
45. Galliard T., Chan H.-W.-S. Lipoxygenases // *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise.* — Vol. 4. Lipids: Structure and Function / Stumpf P. K. (ed.). — NY: Academic Press, 1980. — P. 131–161.
46. Garcia-Viloca M., Alhambra C., Truhlar D. C., Gao J. Quantum dynamics of hydride transfer by bimetallic electrophilic catalysis: synchronous motion of Mg + and H– in xylose isomerase // *J. Am. Chem. Soc.,* 2002, 124, p. 7268–7269.
47. Garcia-Viloca M., Gao J., Karplus M., Truhlar D. C. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations // *Science,* 2004, 303, p. 186–195.
48. Godfrey T., West S. (eds) *Industrial Enzymology.* — 2nd ed. — NY: Stockton Press, 1996.
49. Gretchkin A. N., Hamberg M. The «heterolytic lyase» is an isomerase producing a shortlived fatty acid hemiacetal // *Biochim. Biophys. Acta,* 2004, 1636, p. 47–58.
50. Grosch W. Lipid degradation products and flavour // *Food Flavours. Part A. Introduction* / Morton I. D., MacLeod A. J. (eds.). — NY: Elsevier Scientific Publishing, 1982. — P. 325–398.
51. Gunstone F. D. (ed.). *Lipid Synthesis and Manufacture.* — Boca Raton, FL: CRC Press LLC, 1999. — 472 p.
52. Gutfreund H. *Enzymes: Physical Principles.* — London, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1972. — 242 p.
53. Hebeda R. E., Bowles L. K., Teague W. M. Use of intermediate stability enzymes for retarding staling in baked goods // *Cereal Foods World,* 1991, 36, p. 619–624.
54. Henderson P. J. F. Statistical analysis of enzyme kinetic data // *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry, Part II* / Kornberg H. L., Metcalfe J. C., Northcote D. H., Pogson C. I.,Tipton K. F. (eds.). — Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. — P.B113/1–43.
55. Hildebrand D. F., Hamilton-Kemp T. R., Loughrin J. H., Ali K., Andersen R. A. Lipoxygenase 3 reduces hexanal production from soybean seed homogenates // *J. Agric. Food Chem.,* 1990, 38, p. 1934–1936.
56. Hughes R. K., Wu Z., Robinson D. S. et al. Characterization of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanisms // *Biochem. J.,* 1998, 333, p. 33–43.
57. Hwang I. H., Devine C. E., Hopkins D. L. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness // *Meat Sci.,* 2003, 65, p. 677–691.

58. Inouye K., Lee S.-B., Nambu K., Tonomura B. Effect of pH, temperature, and alcohols on the remarkable activation of thermolysin by salts // *J. Biochem.*, 1997, 122, p. 358–364.
59. Kazlauskas R. J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties // *Trends Biotechnol.*, 1994, 12, p. 464–472.
60. Krest I., Glodek J., Keusgen M. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 3753–3760.
61. Kubec R., Hrbáčová M., Musah R. A., Velišek J. *Allium* discoloration: precursors involved in onion pinking and garlic greening // *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p. 5089–5094.
62. Kuhn H., Heydeck D., Wiesner R., Schewe T. The positional specificity of wheat lipoxygenase: the carboxylic group as a signal for the recognition of the site of hydrogen removal // *Biochim. Biophys. Acta,* 1985, 830, p. 25–29.
63. Kuribayashi T., Kaise H., Uno C., Hara T., Hayakawa T., Joh T. Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus* // *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 1247–1253.
64. Kuettner E. B., Hilgenfeld R., Weiss M. S. The active principle of garlic at atomic resolution // *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, p. 46402–46407.
65. Lancaster J. E., Shaw M. L., Randle W. M. Differential hydrolysis of alk(en)yl cysteine sulphoxides by alliinase in onion macerates: flavour implications // *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 78, p. 367–372.
66. Landolt L. A., Hultin H. O. Inhibition of dimethylamine formation in frozen red hake muscle after removal of trimethylamine oxide and soluble proteins // *J. Food Biochem.*, 1982, 6, p. 111–125.
67. Laratta B., Fasanaro G., De Sio F. et al. Thermal inactivation of pectin methyl esterase in tomato puree: implications on cloud stability // *Proc. Biochem.*, 1995, 30, p. 251–259.
68. Lawson L. D., Wang Z. J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity // *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 2592–2599.
69. Lee C.-H., Parkin K. L. Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases // *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 75, p. 219–227.
70. Loeffler A. Proteolytic enzymes: sources and applications // *Food Technol.*, 1986, 40, p. 63–70.
71. Lowe G. Yuthavong Y. pH-Dependence and structure-activity relationships in the papain-catalysed hydrolysis of anilides // *Biochem. J.*, 1971, 124, p. 117–122.
72. Matsui K., Fukutomi S. Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V., Kajawara T. Effect of over-expression of fatty acid 9-hydroperoxide lyase in tomatoes *(Lycopersicon esculentum* Mill.) // *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 5418–5424.
73. Matusheski N. V., Juvik J. A., Jeffery E. H. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli // *Phytochemistry,* 2004, 65, p. 1273–1281.
74. Meagher M. M., Nikolov Z. L., Reilly P. J. Subsite mapping of *Aspergillus niger* glucoamylases I and II with malto- and isomaltooliogosaccharides // *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 34, p. 681–688.
75. Mithen R. F., Dekker M., Ververk R., Rabot S., Johnson I. T. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods // *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 80, p. 967–984.
76. Monsan P., Combes D. Effect of water activity on enzyme action and stability // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1984, 434, p. 48–60.
77. Nagodawithana T., Reed G. (eds.) *Enzymes in Food Processing.* — 3rd ed. — NY: Academic Press, 1993. — 480 p.
78. Nakanishi K., Takeuchi A., Matsuno R. Long-term continuous synthesis of aspartame precursor in a column reactor with an immobilized thermolysin // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, 32, p. 633–636.
79. Nerinckx W., Desmet T., Claeyssens M. A hydrophobic platform as a mechanistically relevant transition state stabilizing factor appears to be present in the active center of *all* glycoside hydrolases // *FEBS Lett.*, 2003, 538, p. 1–7.
80. Nitta Y., Mizushima M., Hiromi K., Ono S. Influence of molecular structures of substrates and analogues on Taka-amylase A catalyzed hydrolyses // *J. Biochem.*, 1971, 69, p. 567–576.
81. O'Connor C. J., Longbottom J. R. Studies in bile salt solutions. XIX. Determination of Arrhenius and transition-state parameters for the esterase activity of bile-salt-stimulated human milk lipase: hydrolysis of 4-nitrophenyl alkanoates // *J. Coll. Int. Sci.*, 1986, 112, p. 504–512.
82. Osuga D. T., Whitaker J. R. Mechanisms of some reducing compounds that inactivate polyphenol oxidases // *Enzymatic Browning and Its Prevention* / Lee C. Y., Whitaker J. R. (eds.). — Washington, DC: American Chemical Society, 1995. — P. 210–222. — (Symposium series 600).
83. Ovadi J., Aragon J. J., Sols A. Phosphofractokinase and fractosebisphosphatase from muscle can interact at physiological concentration with mutual effects on their kinetic behavior // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1986, 135, p. 852–856.
84. Palmer T. *Understanding Enzymes.* — 4th ed. — NY: Prentice Hall/Ellis Horwood, 1995.
85. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R. Advances in microbial amylases // *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, 31, p. 135–152.
86. Parida S., Dordick J. S. Tailoring lipase specificity by solvent and substrate chemistries // *J. Org. Chem.*, 1993, 58, p. 3238–3244.
87. Parkin K. L., Hultin H. O. Characterization of trimethylamine-N-oxide (TMAO) demethylase activity from fish muscle microsomes // *J. Biochem.*, 1986, 100, p. 77–86.

88. Penet C. S. New applications of industrial food enzymology: economics and processes // *Food Technol.*, 1991, 45, p. 98–100.
89. Persson M., Svensson I., Adlercreutz P. Enzymatic fatty acid exchange in digalatosyl-diacylglycerol // *Chem. Phys. Lipids*, 2000, 104, p. 13–21.
90. Phillippy B. Q., Hultin H. O. Some factors involved in trimethylamine-N-oxide (TMAO) demethylation in post mortem red hake muscle // *J. Food Biochem.*, 1993, 17, p. 251–266.
91. Pickersgill R. W., Jenkins J. A. Crystal structure of polygalacturonase and pectin methylesterase // *Recent Advances in Carbohydrate Engineering* / Gilbert H. J., Davies G. J., Henrissat B., Svensson B. (eds.). — Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1999. — P. 144–149.
92. Pinsirodom P., Parkin K. L. Selectivity of celite-immobilized patatin (lipid acyl hydrolase) from potato *(Solanum tuberosum* L.) tubers in esterification reactions as influenced by water activity and glycerol analogues as alcohol acceptors // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 155–160.
93. Pinsky A., Grossman S., Trop M. Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables // *J. Food Sci.*, 1971, 36, p. 571–572.
94. Pleiss J., Fischer M., Schmid R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site // *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93, p. 67–80.
95. Poutanen K. Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods // *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, 8, p. 300–306.
96. Prigge S. T., Boyington J. C., Faig M., Doctor K. S., Gaffney B. J., Anzel L. M. Structure and mechanism of lipoxygenases // *Biochimie*, 1997, 79, p. 629–636.
97. Raksalkulthai R., Haard N. F. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2003, 43, p. 401–445.
98. Rangarajan M., Hartley B. S. Mechanism of D-fructose isomerization by *Arthrobacter* D-xylose isomerase // *Biochem. J.*, 1992, 283, p. 223–233.
99. Rangheard M.-S., Langrand G., Triantaphylides C., Baratti J. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acids specificity // *Biochem. Biophys. Acta*, 1989, 1004, p. 20–28.
100. Reece P. The role of oxygen in the production of formaldehyde in frozen minced cod muscle // *J. Sci. Food Agric.*, 1983, 34, p. 1108–1112.
101. Resemann J., Maier B., Carle R. Investigations on the conversion of onion aroma precursors S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides in onion juice production // *J. Sci. Food Agric.*, 2004, 84, p. 1945–1950.
102. Robinson D. S., Wu Z., Domoney C., Casey R. Lipoxygenases and the quality of foods // *Food Chem.*, 1995, 54, p. 33–43.
103. Rogalska E., Cudrey C., Ferrato F. Verger R. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases // *Chirality*, 1993, 5, p. 24–30.
104. Saier M. H. Enzyme in Metabolic Pathways. A Comparative Study of Mechanism, Structure, Evolution and Control. — NY: Harper & Row, 1987.
105. Sakurai Y., Ma S.-F., Watanabe H., Yamaotsu N., Hirono S., Kurono Y. et al. Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates // *Pharmaceut. Res.*, 2004, 21, p. 285–292.
106. Sanz C., Olias J. M., Perez A. G. Aroma biochemistry of fruits and vegetables // *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* / Tomas-Barberan F. A., Robins R. J. (eds). — Oxford, UK: Oxford UniversityPress, 1997. — P. 125–155.
107. Sarda L., Desnuelle P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion // *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 30, p. 513–520.
108. Schebor C., Burin L., Burea M. P., Aguilera J. M., Chirife J. Glassy state and thermal inactivation of invertase and lactase in dried amorphous matrices // *Biotechnol. Prog.*, 1997, 13, p. 857–863.
109. Schechter I., Berger A. On the size of the active site of proteases. I. Papain // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1967, 27, p. 157–162.
110. Schechter I., Berger A. On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1968, 32, p. 898–912.
111. Schmid U., Bornscheuer U. T., Soumanou M. M., McNeill G. P., Schmid R. D. Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl,2-palmitoylglycerol by lipase catalysis // *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 64, p. 678–684.
112. Schwimmer S. Influence of water activity on enzyme reactivity and stability // *Food Technol.*, 1980, 34, p. 64–83.
113. Segel I. H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. — NY: John Wiley & Sons, Inc., 1975.
114. Shen C., Parkin K. L. *In vitro* biogeneration of pure thiosulfinates and propanethial-S-oxide // *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 6254–6260.
115. Silvius J. R., Read B. D., McElhaney R. N. Membrane enzymes: artifacts in Arrhenius plots due to temperature dependence of substrate-binding affinity // *Science*, 1978, 199, p. 902–904.
116. Sinnott M. (ed.). *Comprehensive Biological Catalysis. A Mechanistic Reference.* — Vol. I. — San Diego, CA: Academic Press, 1998.
117. Sinnott M. (ed.). *Comprehensive Biological Catalysis. A Mechanistic Reference.* — Vol. III. — San Diego, CA: Academic Press, 1998.

118. Smolensky D. C., Raymond W. R., Hasegawa S., Maier V. P. Enzymatic improvement of date quality. Use of invertase to improve texture and appearance of «sugar wall» dates // *J. Sci. Food Agric.*, 1975, 26, p. 1523–1528.
119. Solomon E. I., Sundaram U. M., Machonkin T. E. Multicopper oxidases and oxygenases // *Chem. Rev.*, 1996, 96, p. 2563–2605.
120. Srere P. A. Why are enzymes so big? // *Trends Biochem. Sci.* 1984, 9, p. 387–390.
121. Srivastava D. K., Bernhard S. A. Metabolite transfer via enzyme-enzyme complexes // *Science*, 1986, 234, p. 1081–1086.
122. Strambini G. B., Gabellieri E. Protein in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding // *Biophys. J.*, 1996, 70, p. 971–976.
123. Sugihara A., Shimada Y., Nakamura M., Nagao T., Tominaga Y. Positional and fatty acids specificities of *Geotricum candidum* // *Prot. Eng.*, 1994, 7, p. 585–588.
124. Szejtli J. *Cyclodextrin Technology.* — Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988. — 450 p.
125. Takahata Y., Noda T., Nagata T. Effect of/6-amylase stability and starch gelatinization during heating on varietal differences in maltose content in sweetpotatoes // *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, p. 2564–2569.
126. Tome D., Nicolas J., Drapon R. Influence of water activity on the reaction catalyzed by polyphenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) from mushrooms in organic liquid media // *Lebensm-Wiss. u.-Technol.*, 1978, 11, S. 38–41.
127. Tucker G. A., Woods L. F. J. (eds.) *Enzymes in Food Processing.* — 2nd ed. — NY: Blackie, 1995.
128. Tyoshimura T., Jhee K.-H., Soda K. Stereospecificity for the hydrogen transfer and molecular evolution of pyridoxal enzymes // *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, 60, p. 181–187.
129. Ueda S., Ohba R. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes* // *Agric. Biol. Chem.* 1972, 36, p. 2382–2392.
130. Vamos-Vigyazo L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables // *CRC Crit. Rev. Food Set Nutr.*, 1981, 21, p. 49–127.
131. Van der Maarel M. J. E. C. ven der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhius H., Dijkhuizem L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family // *J. Biotechnol.*, 2002, 94, p. 137–165.
132. Van Dijk C., Fischer M., Beekhuizen J.-G., Boeriu C., Stolle-Smits T. Texture of cooked potatoes *(Solanum tuberosum).* 3. Pre-heating and the consequences for the texture and cell wall chemistry // *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 5098–5106.
133. Vangrysperre W., Van Damme J., Vandekerckhove J., De Bruyne C. K., Cornells R., Kersters-Hilderson H. Localization of the essential histidine and carboxylate group in D-xylose isomerases // *Biochem. J.*, 1990, 265, p. 699–705.
134. Visser S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review // *Neth. Milk Dairy J.* 1981, 35, p. 65–88.
135. Vliegenthart J. F. G., Veldink G. A. Lipoxygenases // *Free Radicals in Biology* / Pryor W. A. (ed.). — Vol. V. — NY: Academic Press, 1982. — P. 29–64.
136. Wafler U., Shaw M. L., Lancaster J. E. Effect of freezing upon alliinase activity in onion extracts and pure enzyme preparations // *J. Sci. Food Agric.*, 1994, 64, p. 315–318.
137. Walker J. R. L., Ferrar P. H. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1998, 15, p. 457–497.
138. Walsh C. *Enzymatic Reaction Mechanisms.* — San Francisco, CA: W. H. Freeman and Company, 1979.
139. Wehtje E., Adlercreutz P. Lipases have similar water activity profiles in different reactions // *Biotechnol. Lett.*, 1997, 11, p. 537–540.
140. Whitaker J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences. — 2nd ed. — NY: Marcel Dekker, 1994.
141. Whitaker J. R., Voragen A. G. J., Wong D. W. S. (eds.) *Handbook of Food Enzymology.* — NY: Marcel Dekker, 2003.
142. Whitehurst R. J., Law B. A. (eds.) *Enzymes in Food Technology.* — 2nd ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.
143. Wrolstad R. E., Wightman J. D., Durst R. W. Glycosidase activity of enzyme preparations used in fruit juice processing // *Food Technol.*, 1994, 48, p. 90–98.
144. Wu Z., Robinson D. S., Hughes R. K., Casey R., Hardy D., West S. I. Co-oxidation of β-carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases // *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p. 4899–4906.
145. Yagisawa S. Two types of rate-determining step in chemical and biochemical process // *Biochem. J.*, 1989, 263, p. 985–988.
146. Yamaguchi S., Mase T. Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, 34, p. 720–725.
147. Yamamoto T. (ed.) *Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enymes* / The Amylase Research Society of Japan. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1995.
148. Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems // *Science*, 1982, 217, p. 1214–1222.
149. Yoruk R., Marshall M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review // *J. Food Biochem.*, 2003, 27, p. 361–422.
150. Zhang D., Li N., Lok S.-M., Zhang L.-H., Swaminathan K. Isomaltulose synthase (*Pal* I) of *Klebsiella* spp. LX3 // *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, p. 35428–35434.

Часть II

МИНОРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПИЩИ

7. ВИТАМИНЫ

Джесси Ф. Грегори III (*Jesse F. Gregory III*)
Перевод д-ра хим. наук С. В. Макарова под науч. ред. д-ра биол. наук, проф. В. М. Коденцовой, канд. биол. наук О. А. Вржесинской и канд. хим. наук Н. А. Бекетовой

Содержание

7.1. Введение.. 415
7.1.1. Цели этой главы.. 415
7.1.2. Несколько слов о стабильности витаминов. ..415
7.1.3. Токсичность витаминов .416
7.1.4. Источники витаминов. 416
7.2. Обогащение пищевых продуктов нутриентами 417
7.3. Рекомендации по питанию.. ..418
7.4. Методы анализа и источники данных.. .421
7.5. Усвояемость (биодоступность) витаминов. 421
7.6. Причины различного содержания и/или потерь витаминов в пищевых продуктах.....422
7.6.1. Природная вариабельность содержания витаминов 422
7.6.2. Изменение содержания витаминов после сбора урожая (убоя)..... ..423
7.6.3. Влияние предварительной обработки (обрезка, мойка и измельчение)..... 423
7.6.4. Влияние бланширования и тепловой обработки 424
7.6.5. Потери витаминов после переработки.. .424
7.6.6. Влияние технологических добавок и других компонентов пищевых продуктов 426
7.7. Жирорастворимые витамины. ...427
7.7.1. Витамин А.. .427
7.7.1.1. Структура и основные свойства... .427
7.7.1.2. Стабильность витамина А и процессы его разложения. 429
7.7.1.3. Биодоступность. .432
7.7.1.4. Методы анализа .432
7.7.2. Витамин D.. .433
7.7.2.1. Строение и основные свойства .433
7.7.2.2. Методы анализа ...433
7.7.3. Витамин Е... .433
7.7.3.1. Строение и основные свойства .433
7.7.3.2. Стабильность витамина Е и механизм его разложения. ..436
7.7.3.3. Биодоступность... .438
7.7.3.4. Методы анализа 438
7.7.4. Витамин К.. ...438
7.7.4.1. Структура и основные свойства. ..438
7.7.4.2. Методы анализа 438
7.8. Водорастворимые витамины .439
7.8.1. Аскорбиновая кислота. ..439
7.8.1.1. Структура и основные свойства. .439
7.8.1.2. Стабильность витамина С и процессы его разложения. .440
7.8.1.3. Функции аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах. 445
7.8.1.4. Усвояемость.. 446
7.8.1.5. Методы анализа 446

7.8.2. Тиамин 447
7.8.2.1. Структура и общие свойства 447
7.8.2.2. Стабильность тиамина и процессы разложения 448
7.8.2.3. Усвояемость 451
7.8.2.4. Методы анализа . 451
7.8.3. Рибофлавин 451
7.8.3.1. Структура и общие свойства 451
7.8.3.2. Стабильность и процессы разложения 453
7.8.3.3. Биодоступность . 454
7.8.3.4. Методы анализа 454
7.8.4. Ниацин 454
7.8.4.1. Строение и основные свойства . . . 454
7.8.4.2. Усвояемость 455
7.8.4.3. Методы анализа 455
7.8.5. Витамин B_6 456
7.8.5.1. Структура и основные свойства 456
7.8.5.2. Стабильность и процессы разложения 458
7.8.5.3. Усвояемость витамина B_6 . 462
7.8.5.4. Определение содержания витамина B_6 . 462
7.8.6. Фолат . 462
7.8.6.1. Структура и основные свойства 462
7.8.6.2. Стабильность и процессы разложения 465
7.8.6.3. Усвояемость фолатов 469
7.8.6.4. Методы анализа . 469
7.8.7. Биотин 470
7.8.7.1. Структура и основные свойства 470
7.8.7.2. Стабильность 471
7.8.7.2. Усвояемость 471
7.8.7.3. Методы анализа . 471
7.8.8. Пантотеновая кислота 472
7.8.8.1. Структура и основные свойства 472
7.8.8.2. Стабильность и процессы разложения 472
7.8.8.3. Усвояемость 473
7.8.8.4. Методы анализа 473
7.8.9. Витамин B_{12} 473
7.8.9.1. Структура и основные свойства 473
7.8.9.2. Стабильность и процессы разложения 474
7.8.9.3. Усвояемость 475
7.8.9.4. Методы анализа . 475
7.9. Условно эссенциальные витаминоподобные соединения 475
7.9.1. Холин и бетаин 475
7.9.2. Карнитин 476
7.9.3. Пирролохинолин хинон 476
7.9.4. Кофермент Q_{10} 477
7.10. Сохранность витаминов в пищевых продуктах 477
7.10.1. Оптимизация режимов тепловой обработки 478
7.10.2. Прогнозирование потерь витаминов 478
7.10.3. Влияние упаковки . 478
7.11. Краткое резюме 479
Литература . . 479
Дополнительная литература 484

7.1. Введение

7.1.1. Цели этой главы

С момента открытия основных витаминов и их форм было получено очень много данных об их сохранности в период после сбора урожая и в ходе его переработки, при сбыте и хранении пищевых продуктов, а также при кулинарной обработке. Этим проблемам посвящено много обзоров [62, 63, 77], но поскольку в них представлены довольно старые данные, назрела необходимость в обобщении результатов последних научных исследований.

Основная цель этой главы – анализ и критический обзор имеющихся данных по химии витаминов, а также химических и физических факторов, влияющих на их стабильность и усвояемость (биодоступность) из пищи. Вторая цель – это выявление имеющихся пробелов в наших знаниях и определение причин, обусловливающих качество данных о стабильности витаминов. Следует отметить, что до сих пор в номенклатуре витаминов существует ряд неточностей, а также используются устаревшие термины и понятия. В настоящей главе мы будем пользоваться терминами, рекомендуемыми *IUPAC* и Американским обществом диетологов [1].

7.1.2. Несколько слов о стабильности витаминов

Понятие «витамины» объединяет группу разных по строению и свойствам органических соединений, являющихся эссенциальными микронутриентами. Витамины действуют *in vivo* разными способами: 1) как коферменты или их предшественники (ниацин, тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновая кислота, витамин B_6, витамин B_{12}, фолат, витамин К); 2) как компоненты антиоксидантной защитной системы организма (аскорбиновая кислота, некоторые каротиноиды и витамин Е); 3) как факторы генетического регулирования (витамины А, D и, возможно, некоторые другие); 4) как соединения, осуществляющие специфические функции (например, действие витамина А на зрение, аскорбата – в реакциях гидроксилирования).

Витамины являются минорными компонентами пищи. С точки зрения пищевой химии нас прежде всего интересует максимальная сохранность витаминов путем минимизации их экстракции водой (выщелачивания) и происходящие с ними химические изменения (например, окисление и реакции с другими компонентами пищи). Кроме того, некоторые витамины, будучи восстановителями, ловушками свободных радикалов, участниками реакций, приводящих к потемнению продукта, а также предшественниками вкуса и аромата, влияют на химическую природу пищи. Несмотря на то что о стабильности и свойствах витаминов известно уже довольно много, наши знания об их поведении в сложных пищевых системах весьма ограничены. Во многих исследованиях по оценке стабильности витаминов для простоты (а иногда по необходимости) применялись модельные системы или даже буферные растворы. Результаты таких работ следует интерпретировать с осторожностью, поскольку во многих случаях неизвестно, насколько эти модели отражают реальные свойства пищевых систем. Исследования модельных систем дают, конечно, некоторое представление о факторах стабильности витаминов, но это представление отнюдь не исчерпывающее, что обусловлено сложным составом пищи, отличающимся по многим параметрам от упрощенных моделей — по активности воды, ионной силе, значению pH и присутствию ферментов, микроэлементов-катализаторов и других реагентов, в том числе белка, редуцирующих сахаров, свободных радикалов, реакционноспособных форм кислорода и т. д.). В этой главе основное внимание будет уделено поведению витаминов в реальных пищевых системах.

Большинство витаминов существует в различных формах, то есть в виде семейства сходных по структуре соединений со сходными пищевыми функциями. Многократные попытки оценить стабильность витаминов в различных условиях представлены в табл. 7.1 [61]. Основным недостатком такого представления является то, что стабильность разных форм одного и того же витамина в одинаковых условиях может заметно различаться. Например, тетрагидрофолиевая и фолиевая кислоты обладают почти одинаковыми нутритивными свойствами, однако встречающаяся в природе тетрагидрофолиевая кислота подвержена окислительной деградации, а ее синтетический аналог (фолиевая кислота), использующаяся для обогащения пищевых продуктов, весьма стабильна. Таким образом, обобщенные выводы о стабильности витаминов в лучшем случае неточны, а в худшем вообще неверны.

Таблица 7.1
Стабильность витаминов

Нутриент	В нейтральной среде	В кислой среде	В щелочной среде	На воздухе (кислород)	Под действием света	При нагревании	Максимальные потери при кулинарной обработке, %
Витамин A	С	Н	С	Н	Н	Н	40
Аскорбиновая кислота	Н	С	Н	Н	Н	Н	100
Биотин	С	С	С	С	С	С	60
Каротины	С	Н	С	Н	Н	Н	30
Холин	С	С	С	Н	С	С	5
Витамин B_{12}	С	С	С	Н	Н	С	10
Витамин D	С	С	Н	Н	Н	Н	40
Фолат	Н	Н	Н	Н	Н	Н	100
Витамин K	С	Н	Н	С	Н	С	5
Ниацин	С	С	С	С	С	С	75
Пантотеновая кислота	С	Н	Н	С	С	Н	50
Витамин B_6	С	С	С	С	Н	Н	40
Рибофлавин	С	С	Н	С	Н	Н	75
Тиамин	Н	С	Н	Н	С	Н	80
Токоферолы	С	С	С	Н	Н	Н	55

Примечание. Приведенные данные являются качественными характеристиками, лишь приблизительно описывающими стабильность витаминов в различных условиях.

Обозначения: С – стабилен (значительного разрушения не наблюдается); Н – нестабилен (наблюдается существенное разрушение). По [61]

7.1.3. Токсичность витаминов

Помимо пищевой роли следует учитывать потенциальную возможность токсического действия витаминов. В наибольшей степени это относится к витаминам A и D. Случаи проявления токсического действия витаминов почти всегда связаны с чрезмерным потреблением биологически активных добавок (БАД). Токсичность витаминов может проявляться также при неправильном (избыточном) обогащении, как это имело место в инциденте с обогащенным витамином D молоком. Это примеры свидетельствуют о необходимости постоянного контроля состава пищевых продуктов со стороны надзорно-контролирующих органов, ответственных за состояние здоровья населения. Случаи интоксикации нативными витаминами, содержащимися в пище, чрезвычайно редки.

7.1.4. Источники витаминов

Хотя все большей частью населения витамины потребляются в виде биологически активных добавок к пище, главным и наиболее существенным источником витаминов по-прежнему являются пищевые продукты. Различные пищевые продукты обеспечивают людей природными витаминами растительного, животного и микробиологического происхождения, а также теми витаминами, которые добавлялись при обогащении пищевых продуктов. Кроме того, для более полного обеспечения потребности организма в витаминах разработаны обогащенные пищевые продукты, специализированные продукты диетического (лечебного и профилактического) питания, продукты детского питания, энтеральные смеси, а также лекарственные препараты.

Не зависимо от того, содержались ли витамины в пищевом продукте в нативной форме или были специально добавлены, их уровень может уменьшаться по разным причинам (химическое и физическое воздействие). Неизбежны также определенные потери витаминов при хранении в период после сбора урожая в случае фруктов и овощей, при промышленной переработке растительного и животного сырья, при

сбыте, хранении и кулинарной обработке продуктов. Поскольку в настоящее время население потребляет в основном пищевые продукты промышленной переработки, необходимо знать, как и в какой степени в них теряются витамины.

По вопросам стабильности витаминов в пищевых продуктах существует довольно много информации, однако возможности ее использования зачатую ограничены недостатком знаний о кинетике, термодинамике и механизмах реакций при различных условиях. На базе имеющейся информации довольно трудно предсказать, насколько тот или иной вид переработки, хранения и кулинарной обработки повлияет на сохранность витаминов в пище. Без знания кинетических и термодинамических данных трудно подобрать оптимальные условия переработки и хранения пищевых продуктов. Существует большая необходимость проведения дальнейших исследований в области химии витаминов и процессов их разрушения в сложных пищевых системах.

7.2. Обогащение пищевых продуктов нутриентами

В начале XX века дефицит нутриентов являлся в США серьезной проблемой. В сельских районах южных штатов была распространена пеллагра, а у населения всей страны наблюдался дефицит рибофлавина, ниацина, железа и кальция. После принятия в 1938 г. Закона о пищевых продуктах, лекарственных средствах и косметических препаратах были разработаны стандарты идентичности, составившие нормативную базу для обогащения пищевых продуктов нутриентами, особенно некоторых молочных и зерновых продуктов. Подробный анализ исторических и технологических аспектов обогащения продуктов выходит за рамки данной главы, и мы отсылаем читателя к работе [7]. Почти полное исчезновение заболеваний, непосредственно обусловленных дефицитом витаминов, свидетельствует об исключительной эффективности программ обогащения пищевых продуктов и об общем повышении пищевой ценности продуктов в США.

К основным понятиям и терминам, используемым при анализе обогащения пищевых продуктов нутриентами, относятся:

восстановление (*restoration*) — добавление нутриентов в целях достижения исходного содержания основных нутриентов;

фортификация (*fortification*) — добавление нутриентов в количествах, достаточных для того, чтобы данный продукт стал хорошим источником этих нутриентов. При фортификации могут добавляться нутриенты, как исходно не встречающиеся в данном продукте, так и нативно в нём присутствующие для достижения их повышенного содержания;

обогащение (*enrichment*) — добавление точно определенных количеств нутриентов согласно требованиям *FDA* США.

нутрификация (*nutrification*) — общее понятие, охватывающее любое внесение нутриентов в пищу*.

Несмотря на несомненное положительное действие, обогащение пищевых продуктов витаминами и другими нутриентами может сопровождаться риском избыточного их потребления. В связи с этим в США были разработаны правила (см. *U.S. FDA guidelines* [21 *CFR Section* 104.20(*g*)]), согласно которым добавляемый к пище нутриент должен:

быть стабильным в обычных условиях хранения, сбыта и использования;

быть усвояемым из данного продукта;

присутствовать в количествах, не приводящих к чрезмерному его потреблению;

соответствовать поставленной задаче и удовлетворять требованиям безопасности для здоровья.

Кроме того, в этих правилах записано, что «*FDA* не поддерживает обогащение всех пищевых продуктов без разбора». Аналогичные рекомендации разработаны Советом по пищевым продуктам и питанию Американской Медицинской Ассоциации (*AMA*), Институтом технологов-пищевиков (*IFT*) и Отделением пищевых продуктов и питания (*FNB*) Национального исследовательского совета Национальной

* В РФ вместо всех этих терминов принято пользоваться одним термином «обогащение», однако для правильного понимания переводной литературы желательно осознавать тонкие различия между используемыми авторами терминами. Подробнее об этом см. Обогащение пищевых продуктов и биологически активные добавки / Оттавей П. Б. (ред.-сост.). — Перев. с англ. — СПб.: Профессия, 2010. — 312 с. — *Примеч. ред.*

академии [4]. В этих рекомендациях определены условия, при соблюдении которых обогащение (фортификация) бывает оправдано, а именно: 1) неадекватный уровень потребления конкретного нутриента значительной частью населения; 2) данный продукт (или категория продуктов) потребляется достаточно большим числом людей; 3) обеспечена гарантия отсутствия риска превышения допустимого уровня потребления данного нутриента; 4) цена обогащенного продукта приемлема для целевой группы населения. В совместном документе *AMA-IFT-FNB* содержится также заявление о поддержке следующих программ по обогащению пищевых продуктов, действующих и в настоящее время:

> Обогащение муки, хлеба, очищенного (беззародышевого) и белого риса тиамином, рибофлавином, ниацином и железом; восстановление содержания тиамина, рибофлавина, ниацина и железа в продуктах из зерновых; обогащение витамином D цельного молока, питьевого обезжиренного молока, сухого обезжиренного молока; обогащение витамином A маргарина, питьевого обезжиренного молока, сухого обезжиренного молока, йодирование столовой соли. Для населения, проживающего в районах с низким содержанием фтора в воде, в целях предотвращения развития кариеса зубов рекомендуется обогащать пищевые продукты фтором.

В дополнение к указанным мерам с 1 января 1998 г. в обогащаемые продукты из зерновых (в большинство сортов пшеничной муки, рис, продукты из кукурузы, хлебобулочные и макаронные изделия) следует добавлять фолиевую кислоту в целях снижения частоты встречаемости различных врожденных дефектов (в частности, дефекта нервной трубки плода — спина бифида или «расщепленный позвоночник»* — и анэнцефалии), а также повышения уровня потребления фолиевой кислоты населением. Количество вносимой фолиевой кислоты подбирают так, чтобы не допустить чрезмерного ее потребления (более 1 мг/сут) и снизить риск маскировки дефицита витамина B_{12}. Недавно зарегистрированные случаи превышения норм обогащения фолиевой кислотой свидетельствуют о необходимости тщательного контроля всех программ обогащения пищевых продуктов.

Стабильность витаминов в обогащенных пищевых продуктах тщательно изучается. Как следует из табл. 7.2, стабильность внесенных витаминов в обогащенных ими зерновых продуктах очень высока [3, 21]. Аналогичные данные получены для витаминизированных зерновых завтраков (табл. 7.3), что объясняется как использованием стабильных форм витаминов, так и благоприятными условиями хранения (температурой и влажностью). Стабильность витаминов A и D в обогащенных молочных продуктах также весьма удовлетворительна.

7.3. Рекомендации по питанию

Для оценки влияния состава продукта и структуры питания (потребления) на пищевой статус как отдельного человека, так и населения в целом, а также для определения нутритивных эффектов технологий переработки и оборота пищевых продуктов важно иметь стандарт потребления пищевых веществ (рекомендуемые нормы потребления). В этих целях в США были разработаны так называемые Рекомендуемые нормы потребления (*RDA*, РНП), количественные значения которых были определены Комитетом по нормам потребления Отделения пищевых продуктов и питания Института Медицины как «средние суточные уровни потребления нутриентов, достаточные для удовлетворения физиологической потребности в нутриентах практически всего (97–98%) здорового населения с учетом возраста и пола» [70]. Величины РНП устанавливают таким образом, чтобы учесть различия в потребности отдельных индивидов и возможную неполную усвояемость нутриентов. Недостаток знаний об усвояемости витаминов приводит, однако, к некоторой неопределенности этих значений. Во многих других странах, а также международными организациями, в частности ФАО/ВОЗ, были разработаны нормы, аналогичные *RDA*, и они иногда отличаются от американских *RDA* из-за различий в научных подходах.

При этикетировании и маркировке содержание микронутриентов лучше выражать в относительных величинах в сравнении с РНП. С начала 1970-х гг. в США сведения о содержании микронутриентов, выносимые на этикетку, обычно выражают в процентах от РНП (*US RDA*). Эти значения, предложенные

---

* Порок развития позвоночника, часто сочетающийся с грыжей (выпячиванием) оболочек через дефект кости. Зачастую сочетается с дисплазией (недоразвитием) спинного мозга. Порок возникает на 3–4-й неделе беременности и представляет собой неполное закрытие нервной трубки в неполностью сформированном спинном мозге. — *Примеч. ред.*

Таблица 7.2
Стабильность витаминов, добавленных в зерновые продукты. По [21]

Витамин	Заявлено	Обнаружено	Продолжительность хранения, мес., при температуре 23 °С		
			2	4	6
В 1 фунте пшеничной муки					
Витамин А, МЕ	7500	8200	8200	8020	7950
Витамин Е, МЕ[а]	15,0	15,9	15,9	15,9	15,9
Пиридоксин, мг	2,0	2,3	2,2	2,3	2,2
Фолат, мг	0,30	0,37	0,30	0,35	0,3
Тиамин, мг	2,9	3,4		3,4	
В 1 фунте желтой кукурузной муки					
Витамин А, МЕ		7500	7500		6800
Витамин Е, МЕ[а]		15,8	15,8	15,9	
Пиридоксин, мг		2,8	2,8		2,8
Фолат, мг		0,30	0,30		0,29
Тиамин, мг		3,5			3,6
	После выпечки		Через 5 сут хранения (23 °С)		
В 740 г хлеба					
Витамин А, МЕ	7500	8280	8300		
Витамин Е, МЕ[а]	15	16,4	16,7		
Пиридоксин, мг	2	2,4	2,5		
Фолат, мг	0,3	0,34	0,36		

[а] Содержание витамина Е дано в пересчете на *DL*-α-токоферола ацетат.

Таблица 7.3
Стабильность витаминов, добавленных к зерновым завтракам. По [3]

Содержание витамина на 1 г продукта	Исходное значение	Продолжительность хранения	
		3 мес. (при 40 °С)	6 мес. (при 23 °С)
Витамин А, МЕ	193	168	195
Аскорбиновая кислота, мг	2,6	2,4	2,5
Тиамин, мг	0,060	0,060	0,064
Рибофлавин, мг	0,071	0,074	0,67
Ниацин, мг	0,92	0,85	0,88
Витамин D	17,0	15,5	16,6
Витамин Е, МЕ	0,49	0,49	0,46
Пиридоксин, мг	0,085	0,088	0,081
Фолат, мг	0,018	0,014	0,018
Витамин B_{12}, мкг	0,22	0,21	0,21
Пантотеновая кислота, мг	0,42	0,39	0,39

в 1968 г., несколько отличаются от современных РНП (табл. 7.4) [70–72], и эти различия, зачастую незаметные для потребителя, необходимо учитывать. Федеральное законодательство США разрешает *FDA* изменять РНП время от времени по мере поступления новой информации о нутриентах [21 *CFR* §101.9(c)(7)(b)(ii)], однако до сих пор никаких изменений в РНП внесено не было. В 1994 г. *FDA* приняло решение вместо термина «рекомендуемые нормы потребления» (РНП, *RDA*) использовать понятие «рекомендуемое суточное потребление» (*RDI*), количественное значение которого в настоящее время эквивалентно старым РНП. На этикетках содержание витаминов принято указывать в процентах от нормы суточного потребления и маркируется в «% от суточного потребления».

Таблица 7.4

Сравнение рекомендуемых норм потребления (*RDA*) и рекомендуемого суточного потребления (*RDI*) витаминов, используемых при этикетировании пищевых продуктов в США. По [70–72]

Группа населения	Возраст, лет	Витамин А, мкг РЭ[a]	Витамин D, мкг	Витамин Е, мг, в пересчете на *d*-α-токоферол	Витамин К, мкг	Витамин С, мг	Тиамин, мг	Рибофлавин, мг	Ниацин, мг ниацин. экв.	Витамин B_6, мг	Фолат, мкг *DFE*	Витамин B_{12}, мкг	Пантотеновая кислота, мг	Биотин, мкг	Холин, мг
Новорожденные и грудные дети	0,0–0,5	400	5	4	2,0	40	0,2	0,3	2	0,1	65	0,4	1,7	5	125
	0,5–1,0	500	5	5	2,5	50	0,3	0,4	4	0,3	80	0,5	1,8	6	150
Дети	1–3	300	5	6	30	15	0,5	0,5	6	0,5	150	0,9	2	8	200
	4–8	400	5	7	55	25	0,6	0,6	8	0,6	200	1,2	3	12	200
Мужчины	9–13	600	5	11	60	45	0,9	0,9	12	1,0	300	1,8	4	20	375
	14–18	900	5	15	75	75	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	5	25	550
	19–30	900	5	15	120	90	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	5	30	550
	31–50	900	5	15	120	90	1,2	1,3	16	1,3	400	2,4	5	30	550
	51–70	9005	10	15	120	90	1,2	1,3	16	1,7	400	2,4	5	30	550
	>70	900	10	15	120	90	1,2	1,3	16	1,0	400	2,4	5	30	550
Женщины	9–13	600	5	11	60	90	0,9	0,9	12	1,2	300	1,8	4	20	375
	14–18	700	5	15	75	90	1,0	1,0	14	1,3	400	2,4	5	25	400
	19–30	700	5	15	90	90	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	5	30	425
	31–50	700	5	15	90	90	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	5	30	425
	51–70	700	10	15	90	90	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	5	30	425
	>70	700	10	15	90	90	1,1	1,1	14	1,5	400	2,4	5	30	425
Беременные женщины	<18	750	5	15	75	80	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	6	30	450
	19–30	770	5	15	90	85	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	6	30	450
	31–50	770	5	15	90	85	1,4	1,4	18	1,9	600	2,6	6	30	450
Кормящие матери	<18	1200	5	19	75	115	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	7	35	550
	19–30	1300	5	19	90	120	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	7	35	550
	31–50	1300	5	19	90	120	1,4	1,6	17	2,0	500	2,8	7	35	550
RDI[b]		1000 (5000 МЕ)	10 (400 МЕ)	20 (30 МЕ)	*RDI* не определено	60	1,5	1,7	20	2,0	400	6,0	*RDI* не определено	*RDI* не определено	*RDI* не определено

[a] Ед. РЭ – ретиноловый эквивалент (1 мкг РЭ = 1 мкг ретинола или 12 мкг β-каротина, 24 мкг α-каротина, 24 мкг криптоксантина); витамин Е в пересчете на *d*-α-токоферол (токофероловый эквивалент); ниац. экв. – ниациновый эквивалент (1 мг ниац. экв. = 1 мг ниацина или 60 мг триптофана); *DFE* – пищевой фолатный эквивалент (1 мкг *DFE* = 1 мкг природного фолата + 1,7 мкг синтетической фолиевой кислоты).

[b] *RDI* (рекомендуемое суточное потребление) – это показатель, используемый в США для этикетирования пищевых продуктов (ранее применялся показатель *US RDA*, РНП).

7.4. Методы анализа и источники данных

В США основными источниками информации о содержании витаминов в пищевых продуктах являются Национальный банк данных по нутриентам в пищевых продуктах Министерства сельского хозяйства (*U.S. Department of Agriculture's National Nutrient Data Bank*) и 8-й выпуск Справочника по сельскому хозяйству (*Agricultural Handbook No. 8 series*). Существенным недостатком сведений, приведенных в них, и других баз данных является отсутствие необходимой информации об использованных аналитических методах. Зачастую сведения о методах анализа отсутствуют вообще, а иногда неясно, насколько репрезентативны представленные данные. Надежность величин, указанных в справочниках и базах данных по пищевым продуктам, обсуждается в нескольких обзорах [8, 68].

Серьезной проблемой является адекватность аналитических методов определения многих витаминов. Если методы анализа некоторых витаминов (аскорбиновой кислоты, тиамина, рибофлавина, ниацина, витаминов B_6, A и E) достаточно приемлемы, то этого нельзя сказать о методах определения фолата, пантотеновой кислоты, биотина, каротиноидов, витаминов B_{12}, D и K. Факторами, лимитирующими пригодность аналитических методов, являются отсутствие специфичности традиционных химических и микробиологических методов, неполная экстракция анализируемого вещества из матрикса пищевого продукта и проблемы анализа сложных форм витаминов. Для улучшения сложившейся ситуации необходимо продолжить усилия по разработке новых эффективных методов анализа, улучшить подготовку химиков-аналитиков, разработать протоколы контроля качества с валидизацией и стандартизацией процедур, а также создать банки эталонных образцов для определения витаминов. Далее мы кратко рассмотрим преимущества и недостатки методов определения тех или иных витаминов.

7.5. Усвояемость (биодоступность) витаминов

Усвояемостью называют отношение количества нутриента, всосавшегося в кишечнике и выполняющего свои метаболические функции или усвоенного организмом, к общему количеству потребленного нутриента. В широком смысле в понятие усвояемости входит как всасывание, так и утилизация *потребленного* нутриента, а его потери до момента потребления в это понятие не входят. Полное описание нутритивных свойств пищи невозможно без знания трех факторов: содержания витамина в момент потребления, химических форм, в которых он присутствует в пище, а также биодоступности этих форм витамина, присутствующих в составе потребляемого продукта (блюда).

Усвояемость витаминов определяют следующие факторы:

- состав рациона, влияющий на время прохождения пищи через кишечник, вязкость и эмульсионные характеристики, а также значение pH;
- форма витамина (формы могут различаться по скорости и степени всасывания, стабильности данной формы в желудке и кишечнике при переваривании и легкости превращения в метаболически активные или коферментные формы, то есть метаболической функциональности);
- взаимодействия между витамином и другими компонентами пищи (например, белками, крахмалом, пищевыми волокнами и липидами), которые влияют на степень всасывания витамина в кишечнике.

Несмотря на то что объем наших знаний об относительной усвояемости различных форм витаминов постоянно растет, комплексное влияние состава пищи на биодоступность витаминов остается по-прежнему мало изученным. Кроме того, еще недостаточно изучено влияние на усвояемость витаминов способов технологической и кулинарной обработки продуктов, а также способов их хранения.

Вопросы усвояемости обычно рассматривают в связи с разработкой рекомендуемых норм потребления (РНП), но при этом речь идет лишь о средних значениях усвояемости (биодоступности). В настоящее время наши знания недостаточны или слишком фрагментарны для того, чтобы было можно составить таблицу усвояемости витаминов из сложных пищевых систем. Даже если бы мы больше знали об усвояемости витаминов из отдельных пищевых продуктов, эти знания дали бы немного – гораздо важнее знать показатели усвояемости витаминов из *смешанного* рациона в целом (включая взаимовлияние отдельных пищевых продуктов) и зависимость от индивидуальных особенностей конкретного человека.

7.6. Причины различного содержания и/или потерь витаминов в пищевых продуктах

С момента сбора урожая или убоя животных (вылова рыбы) все пищевое сырье неизбежно теряет часть витаминов. Пищевое значение частичной потери витаминов зависит от пищевого статуса конкретного человека или населения в целом, значения пищевого продукта как источника данного витамина и усвояемости последнего. Одной из целей совершенствования технологических процессов, способов хранения и кулинарной обработки пищевых продуктов является именно минимизация потерь витаминов. Далее мы рассмотрим основные факторы, влияющие на содержание витаминов в пищевых продуктах.

7.6.1. Природная вариабельность содержания витаминов

Содержание витаминов в овощах и фруктах обусловлено генетическими особенностями сорта, степенью зрелости, местом произрастания и климатом. Содержание витаминов в процессе созревания зависит от скорости их синтеза и деградации. Увы, для большинства витаминов (за исключением содержания аскорбиновой кислоты и β-каротина в некоторых продуктах) информации о временной зависимости содержания витаминов в ходе вегетации фруктов и овощей нет (из табл. 7.5 следует, что максимальная концентрация аскорбиновой кислоты в томатах достигается еще до полного созревания плода) [95]. Аналогично изменяется и концентрация фолата в томатах, причем к моменту достижения полной зрелости содержание этого витамина снижается на 35%.

Таблица 7.5
Влияние степени зрелости на содержание аскорбиновой кислоты в томатах. По [95]

Количество недель после цветения	Средняя масса плода, г	Цвет	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 г
2	33,4	Зеленый	10,7
3	57,2	Зеленый	7,6
4	102	Зелено-желтый	10,9
5	146	Желто-красный	20,7
6	160	Красный	14,6
7	168	Красный	10,1

В моркови концентрация каротиноидов довольно сильно зависит от ее сорта и меньше — от степени зрелости. О влиянии степени зрелости злаковых и бобовых на содержание витаминов известно довольно мало, поскольку в отличие от овощей и фруктов их убирают почти при одинаковой степени зрелости.

На содержание витаминов в растительном пищевом сырье несомненно влияют применяемые агротехнические методы и условия окружающей среды, однако данных об этом довольно мало. В работе [83] было определено содержание аскорбиновой кислоты и витамина А (по каротиноидам) в некоторых овощах и фруктах, выращенных в шести разных регионах США, и показано, что на содержание витаминов существенно влияет место произрастания растений – географические и климатические условия, а также применяемые агротехнические методы. Последние (в частности, тип и количество вносимых удобрений, режим ирригации), а также экологические условия и генетические особенности того или иного сорта растений, безусловно, влияют на содержание витаминов в растительном сырье, однако их роль учесть довольно трудно. Вполне возможно, что методами генной инженерии в недалеком будущем можно будет получать растения с повышенным содержанием витаминов (например, фолата) или провитаминов (например, β-каротина), то есть осуществлять «биофортификацию» [28].

Содержание витаминов в пищевых продуктах животного происхожения зависит как от вида животного, так и от его питания. Так, содержание витаминов группы В ограничено способностью тканей животного всасывать эти витамины из крови и превращать их в коферментные формы. Неадекватные рационы кормления животных могут привести к снижению содержания водо- и жирорастворимых витаминов в тканях. И наоборот, обогащение кормов жирорастворимыми витаминами (в отличие от водорастворимых) может

быстро повысить их содержание в тканях. Так, было показано, что посредством повышения концентрации витамина Е улучшается стабильность к окислению и дольше сохраняется цвет некоторых продуктов животного происхождения.

7.6.2. Изменение содержания витаминов после сбора урожая (убоя)

Ферментативные процессы в овощах, фруктах и животных тканях продолжаются и после сбора урожая (убоя скота или вылова рыбы), что приводит к изменению содержания в них витаминов. Высвобождение окислительных и гидролитических ферменов при нарушении целостности клеток и компартментализации может приводить к перераспределению химических форм и изменению активности витаминов. Например, дефосфорилирование витамина B_6, тиамина или флавиновых коферментов, дегликозилирование гликозидов витамина B_6, деконъюгация полиглутамилфолатов обусловливают различия в содержании витаминов в тканях до и после сбора урожая (убоя), причем степень этих различий зависит как от физических воздействий (например, температуры), так и от времени, прошедшего от сбора урожая (убоя) до переработки пищевого сырья. На общее содержание витаминов эти изменения влияют мало, сильнее они сказываюся на их усвояемости. Вместе с тем воздействие липоксигеназ может снизить содержание многих витаминов, а аскорбатоксидазы — специфически снизить содержание аскорбиновой кислоты.

Изменения в содержании витаминов после сбора урожая (убоя) неизбежны, но их можно минимизировать путем применения надлежащих процедур. Наибольшие потери лабильных витаминов бывают обусловлены неправильным обращением с растительным сырьем при длительном хранении и транспортировке при температуре окружающей среды. Поскольку растительные ткани метаболически активны, изменения в общем содержании витаминов, а также в соотношении их химических форм зависят от условий хранения. В продуктах животного происхождения потери витаминов в условиях холодильного хранения обычно минимальны.

7.6.3. Влияние предварительной обработки (обрезка, мойка и измельчение)

Очистка и обрезка овощей и фруктов может привести к некоторым потерям витаминов, так как они в значительных количествах содержатся в кожуре, стебле и других удаляемых частях. Эти потери могут оказаться весьма значительными, но их следует рассматривать как неизбежные независимо от того, имеем мы дело с промышленной переработкой или с приготовлением пищи в домашних условиях.

Щелочная обработка, использующаяся для повышения интенсивности очистки при промышленной переработке, приводит к потерям с поверхности продукта таких лабильных витаминов, как фолат, аскорбиновая кислота и тиамин, однако эти потери незначительны по сравнению с общим содержание витаминов в продукте.

Любое взаимодействие разрезанных или измельченных тканей растительного и животного сырья с водой способствует экстракции (вымыванию) водорастворимых витаминов при мойке, транспортировке по желобам с потоком воды и при продолжительном пребывании в рассоле в ходе кулинарной обработки. Степень этих потерь зависит от факторов, определяющих диффузию и растворимость витаминов, в том числе от значения pH, которое влияет на растворимость и диссоциацию витаминов из участков связывания внутри клетки, от ионной силы экстрагирующего раствора, от температуры, от соотношения объемов продукта и водного раствора, а также от отношения площади поверхности частиц к их объему. Разрушение витамина после экстракции зависит от концентрации растворенного кислорода в растворе, ионной силы, содержания и вида примесей микроэлементов — катализаторов, а также от присутствия в растворе других способствующих разложению веществ (например, хлора), или, наоборот, стабилизаторов (например, некоторых восстановителей).

При помоле зерновых происходит измельчение и фракционирование зерен в целях удаления оболочек и зародыша. Поскольку многие витамины сконцентрированы как раз в них, то при помоле теряется большое количество витаминов (рис. 7.1) [102]. Эти потери, а также распространенность заболеваний, обусловленных дефицитом витаминов, явились причиной для внедрения программ по обогащению зерновых продуктов витаминами и минеральными веществами – рибофлавином, ниацином, тиамином, железом, кальцием и, позднее, фолиевой кислотой. Положительный эффект от этих программ оказался огромным.

7.6.4. Влияние бланширования и тепловой обработки

В переработке овощей и фруктов одной из необходимых технологических стадий является бланширование (мягкая тепловая обработка), которое проводят перед последующими операциями для инактивации вредных ферментов, снижения микробной загрязненности и уменьшения газообразования в кишечнике. Инактивация ферментов зачастую повышает стабильность многих витаминов в ходе хранения.

Для бланширования используют горячую воду, пар, горячий воздух или микроволновое излучение. Бланширование в горячей воде может привести к большим потерям водорастворимых витаминов за счет их вымывания (рис. 7.2). Снижение содержания витаминов может также наблюдаться вследствие окисления в ходе последующей тепловой обработки. Показано, что кратковременная высокотемпературная обработка повышает сохранность термолабильных нутриентов. Особенности бланширования подробно описаны в работе [128].

Влияние тепловой обработки на содержание витаминов довольно хорошо изучено [62, 63, 77, 123]. Повышенные температуры ускоряют процессы, протекающие при комнатной температуре довольно медленно. Потери витаминов при тепловой обработке зависят от химической природы данного продукта, их химического окружения (значение pH, относительная влажность, присутствие металлов переменной валентности, других реакционноспособных веществ, концентрация растворенного кислорода и т. д.), стабильности конкретных присутствующих форм витаминов и их способности к вымыванию. Пищевое значение этих потерь определяется их величиной и важностью продукта как источника данного витамина в обычном рационе. Потери витаминов при консервировании овощей представлены в табл. 7.6 (при пользовании этой таблицей необходимо учитывать приблизительный характер приводимых данных) [93].

7.6.5. Потери витаминов после переработки

Потери витаминов при хранении пищевых продуктов меньше, чем снижение их содержания при тепловой обработке, но они достаточно существенны. Относительно небольшие потери витаминов после переработки обусловлены следующими факторами:

небольшими скоростями реакций при комнатной и более низких температурах;

возможностью удаления растворенного кислорода;

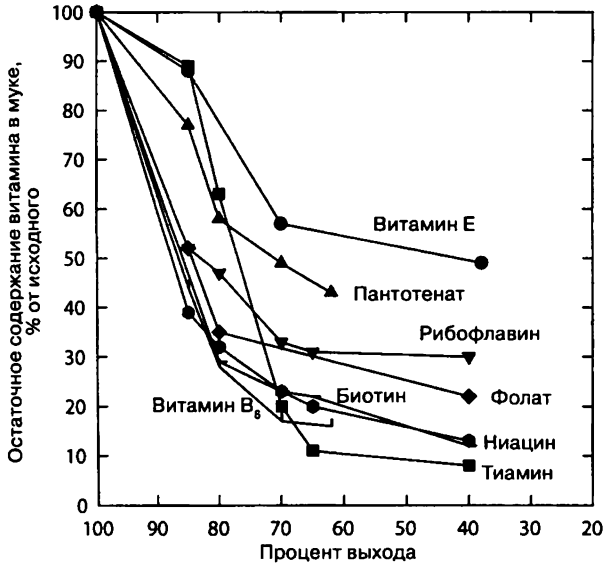


Рис. 7.1. Зависимость остаточного содержания витаминов в пшеничной муке от степени ее очистки. Под процентом выхода в данном случае понимают отношение массы муки к массе взятого для помола исходного цельного зерна. По [102]

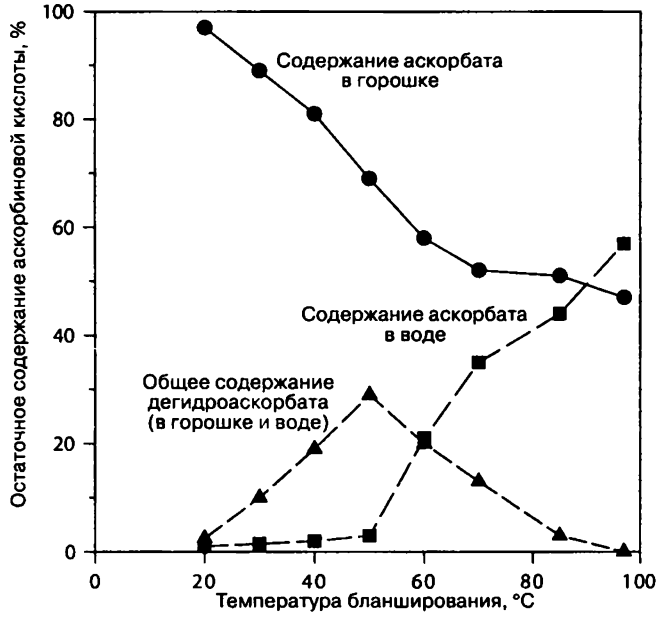


Рис. 7.2. Остаточное содержание аскорбиновой кислоты в зеленом горошке при 10-минутном бланшировании в горячей воде при различных температурах. По [128]

Таблица 7.6
Типичные потери витаминов при консервировании[а], %. По [93]

Продукт	Биотин	Фолат	Витамин B_6	Пантотеновая кислота	Витамин А	Тиамин	Рибофлавин	Ниацин	Витамин С
Спаржа	0	75	64		43	67	55	47	54
Лимская фасоль		62	47	72	55	83	67	64	76
Зеленостручковая фасоль		57	50	60	52	62	64	40	79
Свекла		80	9	33	50	67	60	75	70
Морковь	40	59	80	54	9	67	60	33	75
Кукуруза	63	72	0	59	32	80	58	47	58
Грибы	54	84		54		80	46	52	33
Зеленый горошек	78	59	69	80	30	74	64	69	67
Шпинат	67	35	75	78	32	80	50	50	72
Томаты	55	54	–	30	0	17	25	0	26

[а] Включая бланширование.

изменением значения pH в процессе переработки продукта (обычно оно снижается) из-за влияния температуры или изменения концентрации (при сушке или замораживании), что положительно сказывается на стабильности таких витаминов, как тиамин и аскорбиновая кислота. Изменение содержания витамина С в консервированном картофеле в процессе хранения после термической обработки приведено на рис. 7.3.

Из представленных на рисунке данных можно сделать вывод об относительной важности перехода в отвар, химического разрушения и вида упаковки (жестяная банка или гибкая упаковка) [123].

Стабильность витаминов в продуктах со средним содержанием влаги существенно зависит, помимо прочего, от активности воды. В отсутствие окисляющихся жиров водорастворимые витамины при активности воды, меньшей или равной гидратации в монослое (около 0,2–0,3 a_w), разлагаются незначительно. Скорость разрушения возрастает пропорционально активности воды в области гидратации в мультислое, что является отражением повышения растворимости витаминов, потенциальных реагентов и катализаторов. Влияние активности воды на стабильность жирорастворимых витаминов и каротиноидов аналогично ее влиянию на ненасыщенные жиры — наименьшая скорость разрушения наблюдается при гидратации в монослое, а при более высоких или низких ее значениях скорость разложения увеличивается (см. главу 2). Значительные потери легко окисляющихся витаминов могут наблюдаться при пересушке пищевых продуктов.

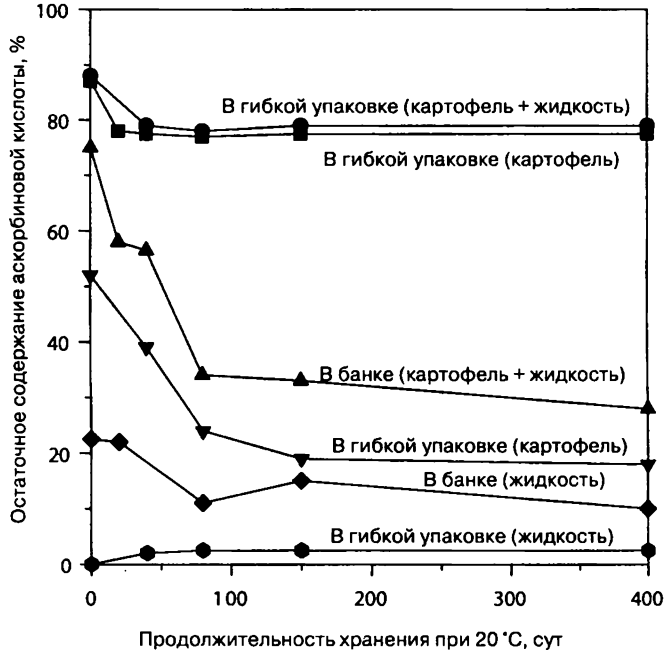


Рис. 7.3. Зависимость остаточного содержания и распределения аскорбиновой кислоты в картофеле после тепловой обработки в жестяных банках или гибкой упаковке от продолжительности хранения. Показано содержание аскорбиновой кислоты в процентах от исходного до тепловой обработки в картофеле и в жидкости в упаковке. По [123]

7.6.6. Влияние технологических добавок и других компонентов пищевых продуктов

Химический состав пищи может существенно влиять на стабильность витаминов. Окислители непосредственно вызывают разрушение аскорбиновой кислоты, фолата, витаминов А и Е, каротиноидов, а также могут косвенно влиять на другие витамины. Степень воздействия окислителей определяется их концентрацией и окислительным потенциалом. Восстановители (редуцирующие соединения), например, аскорбиновая и изоаскорбиновая кислоты, а также различные тиолы, благодаря их способности восстанавливать и являться ловушкой кислорода и свободных радикалов, наоборот, повышают стабильность окисляющихся витаминов, в частности тетрагидрофолата. Рассмотрим, не вдаваясь в детали, влияние различных химических технологических добавок на стабильность витаминов (особенности, касающиеся конкретных витаминов, рассматриваются далее в соответствующих разделах).

В пищевых технологиях применяют несколько соединений хлора — хлорноватистую кислоту (HOCl), гипохлорит (OCl^-), молекулярный хлор (Cl_2) и его диоксид (ClO_2). Эти соединения могут взаимодействовать с витаминами, вступая в реакции электрофильного замещения, окисления и хлорирования двойных связей. Влияние хлорированной воды на степень потерь витаминов в пищевых продуктах изучено еще недостаточно, однако при воздействии хлорированной воды только на поверхность продукта вряд ли следует ожидать больших потерь витаминов. Хлорирование хлебопекарной муки, по-видимому, мало влияет на витамины, содержащиеся в других используемых при выпечке ингредиентах, поскольку концентрация остаточного хлора ничтожно мала. Продукты реакций указанных соединений хлора с витаминами по большей части неизвестны.

Сульфит и другие сульфитирующие соединения (SO_2, бисульфит и метабисульфит) используют при производстве вин как антимикробные реагенты, а в высушенных продуктах — для предотвращения потемнения, обусловленного действием ферментов. Эти соединения оказывают защитный эффект на аскорбиновую кислоту и отрицательно действуют на ряд других витаминов. Сульфит-ионы непосредственно реагируют с тиамином, инактивируя его. Сульфит также взаимодействует с карбонильными группами, переводя альдегидные формы витамина B_6 (пиридоксаль и пиридоксаль фосфат) в их неактивные сульфонатные производные. Степень влияния сульфитирующих соединений на другие витамины изучена недостаточно.

Нитрит применяют при консервировании и посоле мясных продуктов; он может образовываться также из исходно присутствующего нитрата в ходе восстановления микроорганизмами. Для предотвращения образования N-нитрозаминов к нитритсодержащим мясным продуктам добавляют аскорбиновую (АК) или изоаскорбиновую кислоты. При взаимодействии нитрита с этими восстановителями образуется NO, предотвращая образование нежелательного азотистого ангидрида (N_2O_3). Схема реакции аскорбиновой кислоты с азотистой кислотой выглядит следующим образом:

$$АК + HNO_2 \rightarrow \text{2-нитритный эфир аскорбиновой кислоты} \rightarrow \text{радикал полудегидроаскорбата} + NO.$$

NO (оксид двухвалентного азота) связывается миоглобином, и образующийся при этом комплекс придает мясным продуктам специфический цвет. Второй продукт реакции — радикал полудегидроаскорбата — частично сохраняет активность, присущую витамину С.

Химические стерилизаторы применяют в особых целях, в частности для дезинфекции специй оксидами этилена и пропилена. В основе биоцидных свойств этих соединений лежит алкилирование белков и нуклеиновых кислот. Аналогичные реакции также известны для некоторых витаминов, однако их влияние на изменение содержания последних невелико.

Стабильность таких витаминов, как тиамин и аскорбиновая кислота, в значительной степени определяется химическими соединениями и пищевыми ингредиентами, которые влияют на значение pH, особенно в нейтральных и слабокислых средах (подкисление стабилизирует эти витамины, а щелочные реагенты, наоборот, снижают стабильность аскорбиновой и пантотеновой кислот, тиамина и некоторых фолатов).

7.7. Жирорастворимые витамины

7.7.1. Витамин А

7.7.1.1. Структура и основные свойства

Витамин А — это группа биологически активных ненасыщенных углеводородов пищи, включающая ретинол и другие ретиноиды (рис. 7.4), а также некоторые каротиноиды (рис. 7.5). В животных тканях витамин А проявляет свою активность прежде всего в форме ретинола или его эфиров, ретиналя и в меньшей степени — ретиноевой кислоты. Концентрация витамина А максимальна в печени, основном депо организма, где этот витамин присутствует преимущественно в виде ретинола и его эфиров. В группу ретиноидов включают ретинол и его производные с четырьмя изопреноидными фрагментами. Некоторые ретиноиды-аналоги активных форм витамина А обладают ценными фармакологическими свойствами. Кроме того, синтетические ретинила ацетат и пальмитат широко используются для обогащения пищевых продуктов.

Существенной активностью витамина А в пищевых продуктах растительного и животного происхождения обладают также каротиноиды. Провитаминной А-активностью обладают около 50 соединений примерно из 600 известных каротиноидов (*in vivo* они частично превращаются в витамин А). Витамин А в форме ретинола и других ретиноидов в растениях и грибах не встречается, и их витаминная А-активность обусловлена присутствием каротиноидов. Структура некоторых каротиноидов и их активность относительно витамина А, определенная в экспериментах на крысах и выраженная в значениях *RAE* (*Retinol Activity Equivalent*, эквивалент ретиноловой активности), представлены на рис. 7.5, а свойства каротиноидов как пищевых красителей рассматриваются в главе 9.

Чтобы соединение обладало свойствами витамина А или провитаминой А-активностью, оно должно иметь структурные сходства с ретинолом, а именно одного неоксигенизированное β-иононовое кольцо, а в конце изопреноидной боковой цепи должна находиться спиртовая, альдегидная или карбоксильная группа (см. рис. 7.4).

Принято считать, что такие каротиноиды, как β-каротин (см. рис. 7.5), обладают свойствами провитамина А до тех пор, пока в слизистой оболочке кишечника центральная C^{15}—$C^{15'}$-связь не подвергнется ферментативному окислительному расщеплению с образованием двух молекул активного ретиналя. Наибольшей провитаминной активностью среди каротиноидов обладает β-каротин. Гидроксилированные или имеющие карбонильные группы каротиноиды с наличием кислородсодержащих заместителей только в одном кольце обладают меньшей А-активностью, чем β-каротин, а если эти заместители присутствуют в двух кольцах, то провитаминная А-активность вообще отсутствует. Хотя из одной молекулы β-каротина теоретически образуется две молекулы витамина А, малая эффективность этого процесса приводит к тому, что β-каротин обладает вдвое меньшей активностью витамина А, чем ретинол (по массе). В связи с этим было высказано предположение, что витаминная активность ретинола и β-каротина соотносятся как 1 2 (по массе). У разных людей и особей животных утилизация каротиноидов может различаться (см. далее раздел 7.7.1.3). Существуют также разные мнения относительно количества β-каротина, экви-

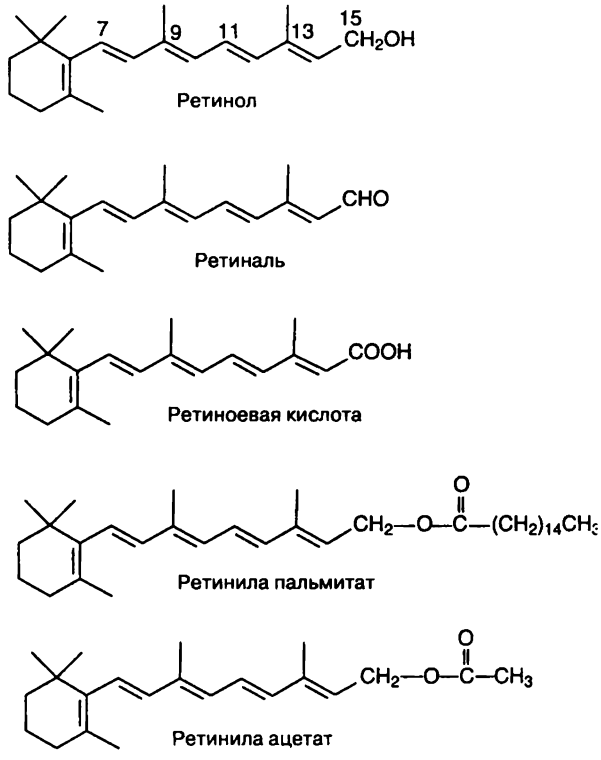
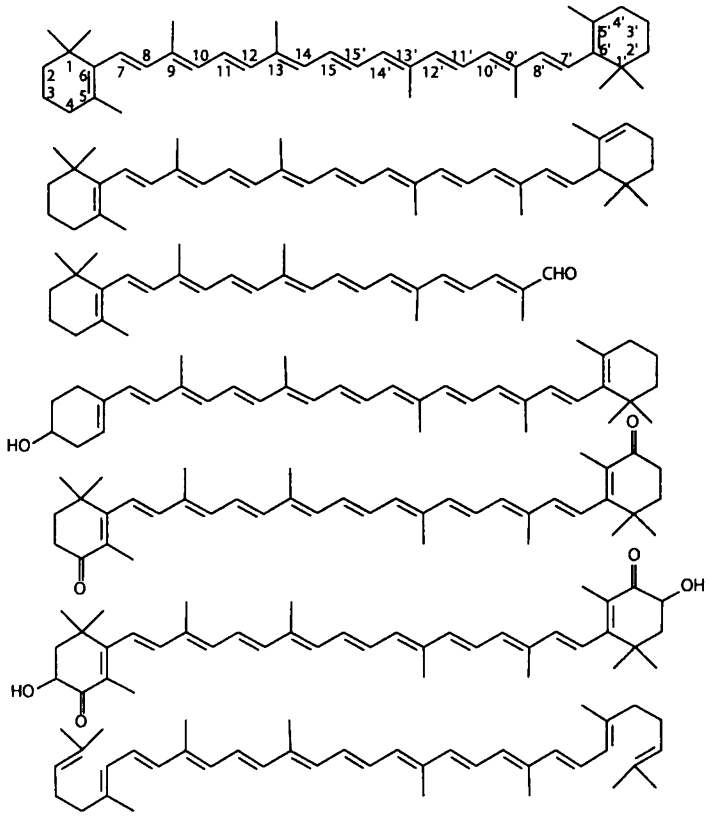


Рис. 7.4. Структурные формулы наиболее распространенных ретиноидов



Соединение	Относительная активность	Величина ретинолового эквивалента
β-Каротин	25	12
α-Каротин	25	24
α-апо-8'-каротиналь	25–30	
Криптоксантин	25	24
Кантаксантин	0	
Астацин	0	
Ликопин	0	

Рис. 7.5. Структурные формулы некоторых каротиноидов и их провитаминая А-активность. Значения относительной активности основаны на предположении, что β-каротин обладает 50%-ной активностью относительно ретинола, и их следует рассматривать как максимальные оценки. Величина ретинолового эквивалента – это количество каротиноида (мкг), обладающего провитаминной А-активностью, соответствующей 1 мкг ретинола

валентного витамину А. На основе проведенных не так давно исследований Института медицины США по биодоступности и биоконверсии (то есть превращения каротиноидов в витамин А) предложено выражать витаминную активность в единицах, эквивалентных активности ретинола [72]. В этой системе величины эквивалентов ретиноловой активности ретинола, β-каротина и иных каротиноидов соотносятся с витаминной активностью как 1 12 : 24 (по массе). Так, 12 мкг β-каротина из обычных пищевых продуктов эквивалентны по активности 1 мкг ретинола. Для проявления каротиноидами антиоксидантной активности *in vivo*, в отличие от витаминной А-активности, необходимо, чтобы в процессе всасывания участвовала исходная молекула каротиноида [15].

Благодаря своей неполярной структуре ретиноиды и каротиноиды (провитамины А) очень липофильны и поэтому образуют в пищевых продуктах и в живых клетках ассоциаты с липидами, специфическими органеллами или транспортными белками. Установлено, что во многих пищевых системах ретиноиды и каротиноиды ассоциированы с диспергированными в воде жировыми капельками или мицеллами. Например, и ретиноиды, и каротиноиды присутствуют в жировых глобулах молока, тогда как в апельсиновом соке каротиноиды ассоциированы с диспергированными маслами. Благодаря системе сопряженных двойных связей каротиноиды интенсивно поглощают свет в видимом диапазоне, что обусловливает их желто-оранжевый цвет. Наибольшую витаминную А-активность проявляют полностью *транс*-изомеры, которые являются наиболее распространенными природными каротиноидами пищевых продуктов (см. табл. 7.7 и 7.8) [2, 158], а их превращение в *цис*-изомеры при тепловой обработке приводит к снижению витаминной активности.

Таблица 7.7
Относительная витаминная А-активность стереоизомерных форм производных ретинола [2]

Изомер	Относительная витаминная А-активность[a]	
	Ретинил ацетат	Ретиналь
Полностью *транс*	**100**	**91**
13-*цис*	**75**	**93**
11-*цис*	**23**	**47**
9-*цис*	**24**	**19**
9,13-ди-*цис*	**24**	**17**
11,13-ди-*цис*	**15**	**31**

[a] Молярная витаминная А-активность (как витамина А) приводится относительно активности полностью *транс*-ретинил ацетата (определена в опытах на крысах).

Таблица 7.8
Относительная витаминная А-активность стереоизомерных форм каротинов [158]

Соединения и изомеры	Относительная витаминная А-активность[a]
β-каротин	
полностью *транс*	100
9-*цис* (нео-U)	38
13-*цис* (нео-В)	53
α-каротин	
полностью *транс*	53
9-*цис* (нео-U)	13
13-*цис* (нео-В)	16

[a] Активность выражена относительно таковой для полностью *транс*-β-каротина (определено в опытах на крысах)

Необходимо отметить, что каротиноиды, не обладающие витаминной активностью, могут, тем не менее, играть важную для здоровья роль, поскольку некоторые каротиноиды концентрируются в определенных тканях, выполняющих специфические антиоксидантные функции. Особенно важна роль ликопина в простате и зеаксантина и лютеина в сетчатке глаза, что подтверждается эпидемиологическими исследованиями.

7.7.1.2. Стабильность витамина А и процессы его разложения

Разложение витамина А (ретиноидов и каротиноидов с витаминной А-активностью) проходит обычно параллельно с окислительным разложением ненасыщенных липидов. Те же факторы, которые ускоряют окисление ненасыщенных жиров, способствуют и разложению витамина А либо за счет прямого окисления, либо косвенного действия свободных радикалов. Изменение содержания β-каротина в вареной и затем высушенной моркови в ходе переработки и связанным с нею воздействием кислорода приведено в табл. 7.9 [27]. Следует отметить, однако, что длительное хранение продуктов, обогащенных витамином А (зерновых завтраков, детского питания, питьевого молока, сахара и приправ), обычно не приводит к существенным потерям внесенного витамина А.

Потери витаминной активности ретиноидов и каротиноидов в пище обусловлены прежде всего превращениями ненасыщенной изопреноидной боковой цепи — автоокислением или изомеризацией.

При повышенных температурах ретиноиды и каротиноиды до некоторой степени изомеризуются. Данные ВЭЖХ свидетельствуют, что во многих пищевых продуктах присутствуют смеси полностью *транс*- и *цис*-изомеров этих соединений. Как показано в табл. 7.10, для инициации изомеризации с последующей потерей витаминной активности достаточно обычного консервирования фруктов и овощей [19]. Помимо действия повышенных температур, превращение полностью *транс*-изомеров ретиноидов и каротиноидов в различные *цис*-формы может происходить под действием света, кислот, хлорсодержащих растворителей (например, хлороформа), а также разбавленного раствора йода.

Табоица 7.9
Содержание β-каротина в вареной моркови, высушенной разными способами [27]

Морковь	Содержание β-каротина, мкг/г сухого вещества
Свежая	980–1860
Высушенная в потоке горячего воздуха	805–1060
Сублимационной сушки	870–1125
Обычной сушки на воздухе	636–987

Таблица 7.10
Содержание изомеров β-каротина в некоторых свежих и переработанных овощах и фруктах [19]

Продукт	Вид переработки	Содержание изомеров β-каротина, % от общего содержания		
		13-*цис*	Полностью *транс*	9-*цис*
Сладкий картофель	Свежий	0,0	100,0	0,0
	Консервированный	15,7	75,4	8,9
Морковь	Свежая	0,0	100,0	0,0
	Консервированная	19,1	72,8	8,1
Тыква	Свежая	15,3	75,0	9,7
	Консервированная	22,0	66,6	11,4
Шпинат	Свежий	8,8	80,4	10,8
	Консервированный	15,3	58,4	26,3
Листовая капуста	Свежая	16,6	71,8	11,7
	Консервированная	26,6	46,0	27,4
Огурец	Свежий	10,5	74,9	14,5
Маринованные корнишоны	Пастеризованные	7,3	72,9	19,8
Томаты	Свежие	0,0	100,0	0,0
	Консервированные	38,8	53,0	8,2
Персики	Свежие	9,4	83,7	6,9
	Консервированные	6,8	79,9	13,3
Абрикосы	Высушенные	9,9	75,9	14,2
	Консервированные	17,7	65,1	17,2
Нектарины	Свежие	13,5	76,6	10,0
Слива	Свежая	15,4	76,7	8,0

О существовании *цис*-изомеров каротиноидов известно давно (рис. 7.6). Предыдущая номенклатура изомеров β-каротина была разработана на основе хроматографических данных и включала как нео-β-каротин U (9-*цис*-β-каротин), так и нео-β-каротин B (13-*цис*-β-каротин). Расхождения в опубликованных материалах вызваны тем, что первоначально нео-β-каротин B был неправильно идентифицирован как 9,13'-ди-*цис*-β-каротин [145]. Аналогичная изомеризация характерна и для других каротиноидов. Максимальное содержание *цис*-изомеров в консервированных фруктах и овощах составляет около 40% 13-*цис*-β-каротина и 30% 9-*цис*-β-каротина (табл. 7.10). Содержание *цис*-изомеров β-каротина в переработанных пищевых продуктах близко к равновесным их значениям, полученным при изучении катализируемой йодом изомеризации β-каротина, что свидетельствует о независимости вида и степени изомеризации от ее механизма.

Фотохимическая изомеризация витамина А может протекать как непосредственно, так и с участием фотосенсибилизатора. Соотношение получающихся *цис*-изомеров и их количество зависят от механизма этого процесса. Фотоизомеризация полностью *транс*-β-каротина включает последовательность обратимых реакций, причем каждая изомеризация сопровождается фотохимическим разложением (рис. 7.7). Аналогичные скорости фотоизомеризации и фоторазложения наблюдались в водных дисперсиях β-каротина и в морковном соке. Те же фотохимические превращения протекают при воздействии света на ретиноиды

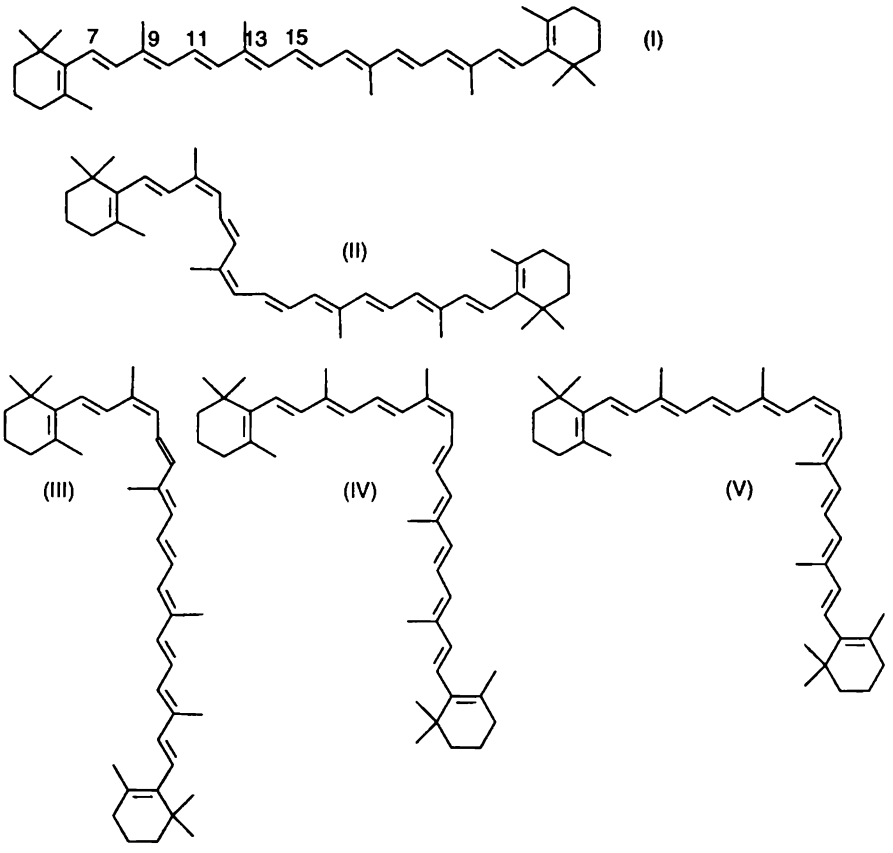


Рис. 7.6. Структура некоторых *цис*-изомеров β-каротина: I — полностью *транс*-изомер; II — 11,15-ди-*цис*-изомер; III — 9-*цис*-изомер; IV — 13-*цис*-изомер; V — 15-*цис*-изомер

в пищевых продуктах (например, в молоке). Значительное влияние на активность витамина А при хранении на свету может оказывать материал упаковки.

Окислительное разложение витамина А и каротиноидов в пищевых продуктах может происходить либо за счет прямого образования перекисей, либо вследствие действия свободных радикалов, образующихся при окислении жирных кислот. При низких концентрациях кислорода (менее 0,2 атм. O_2) β-каротин и, возможно, другие каротиноиды обладают антиоксидантными свойствами, однако при более высоких концентрациях кислорода они могут действовать как прооксиданты [15]. Антиоксидантные свойства β-каротина обусловлены его реакциями с синглетным кислородом, а также гидроксильным, супероксидным и пероксильным (ROO•) радикалами. Последние реагируют с β-каротином с образованием аддукта (ROO-β-каротин•), в котором фрагмент ROO присоединен к C^7 атому углерода β-каротина, а неспаренный электрон делокализован системой сопряженных двойных связей. Этот аддукт затем распадается с образованием эпоксида и других продуктов. По-видимому, β-каротин не образует радикалов, вызывающих обрыв цепи (с передачей H•) в отличие от фенольных антиоксидантов. Антиоксидантное поведение β-каротина приводит к частичной или полной утрате им витаминных свойств независимо от механизма инициирования цепной реакции. Следует отметить, что при взаимодействии с ретинолом и эфирами ретинола свободные радикалы атакуют в основном позиции C^{14} и C^{15}.

При окислении β-каротина образуется 5,6-эпоксид, который изомеризуется в 5,8-эпоксид (мутахром). Последний является первичным продуктом фотохимического окисления β-каротина. При высокотемпературной обработке β-каротин распадается до низкомолекулярных летучих соединений, которые существенно влияют на запах продукта. Аналогичные механизмы разложения характерны и для ретиноидов. Схема этих реакций и других химических аспектов приведена на рис. 7.7.

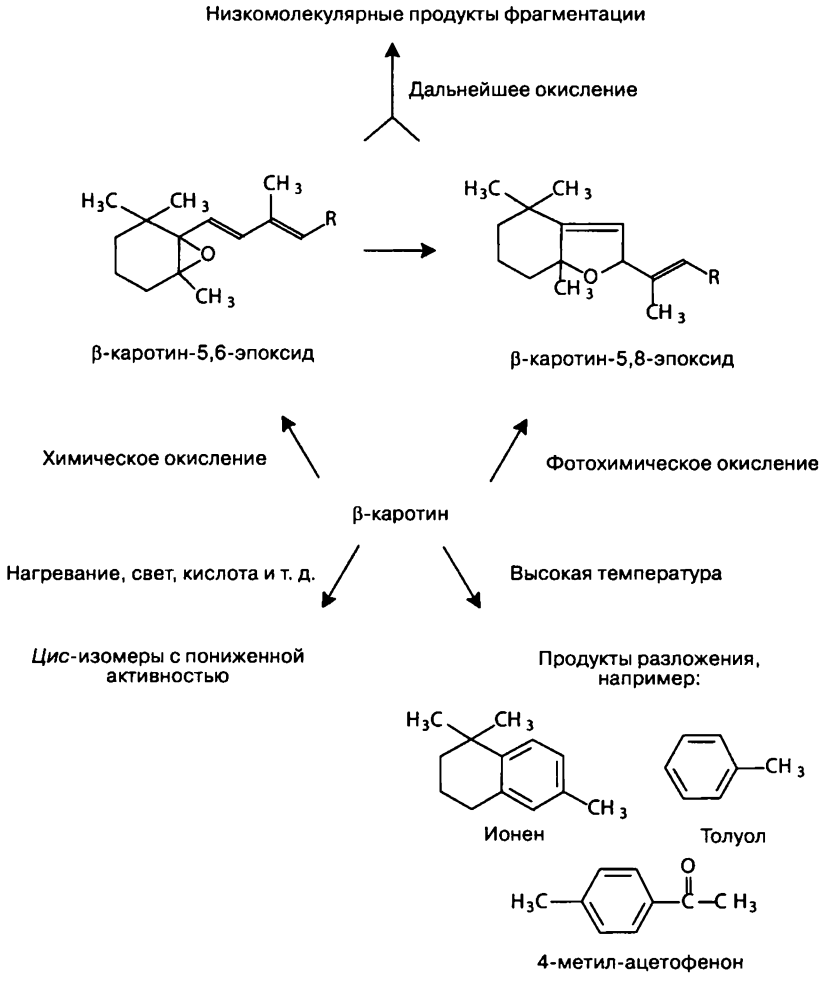


Рис. 7.7. Механизмы разложения и окисления каротиноидов

7.7.1.3. Биодоступность

Ретиноиды всасываются достаточно эффективно, за исключением условий, неблагоприятных для всасывания жиров. Ретинилацетат и ретинилпальмитат усваиваются в виде неэтерифицированного ретинола. Рационы, содержащие неусваиваемые гидрофобные вещества (например, некоторые заменители жира), характеризуются пониженным всасыванием витамина А, но при обогащении им риса витамин А усваивается достаточно хорошо. Каротиноиды, не обладающие свойствами провитамина А, всасываются хуже, чем ретинол. Эти каротиноиды, содержащиеся во многих пищевых продуктах, плохо всасываются в кишечнике из-за образования каротинопротеинов или связывания их с плохо перевариваемыми растительными тканями. Человеком усваивается лишь 21% β-каротина из моркови. Плохо усваивается и β-каротин из капусты брокколи [12].

7.7.1.4. Методы анализа

Первые методы анализа витамина А были основаны на реакциях ретиноидов с кислотами Льюиса (трихлоридом сурьмы, трифторуксусной кислотой), в результате которых раствор окрашивался в синий цвет. Использовались также флуорометрические методы [143]. Определению витамина А в пищевых продуктах зачастую мешало присутствие других веществ. Кроме того, указанные методы не позволяли раздельно

определять содержание *цис-* и *транс*-изомеров, что приводило к ошибкам в оценках общей витаминной или провитаминной активности, поскольку рассчитывать ее по сумме всех изомерных форм нельзя — *цис*-изомеры являются менее активными нутриентами, чем полностью *транс*-изомеры. Более предпочтительно использовать методы ВЭЖХ, поскольку они дают возможность достаточно точно определить концентрацию отдельных ретиноидов [143]. Измерение содержания каротиноидов является сложной задачей, так как в пищевых продуктах присутствует сложная смесь разных химических форм этих соединений [78].

7.7.2. Витамин D

7.7.2.1. Строение и основные свойства

К витаминам группы D относятся жирорастворимые аналоги стерола, в том числе холекальциферол (витамин D_3) животного происхождения и эргокальциферол (витамин D_2), получаемый синтетическим путем (рис. 7.8). Для обогащения пищевых продуктов применяют синтетические формы двух этих витаминов. Холекальциферол образуется в коже человека под воздействием солнечного света в результате многостадийного процесса, включающего фотохимическую модификацию 7-дегидрохолестерола, после чего следует неферментативная изомеризация. Потребность в холекальциферole, получаемом с пищей, зависит от того, насколько интенсивно человек подвергается действию солнечных лучей. Эргокальциферол является исключительно синтетической формой витамина D. Его получают, облучая растительный стерол (фитостерол) ультрафиолетовым светом. *In vivo* образуется несколько гидроксилированных метаболитов витаминов D_2 и D_3. Важнейшей физиологически активной формой, участвующей в регулировании всасывания и метаболизма кальция, является 1,25-дигидроксихолекальциферол. Помимо холекальциферола значительный вклад в витаминную активность мясных и молочных продуктов вносит также 25-гидроксихолекальциферол.

Значительную роль в обеспечении необходимого потребления витамина D играет обогащение различных жидких молочных продуктов эргокальциферолом или холекальциферолом. Этот витамин чувствителен к действию света, так что при хранении молока в стеклянных бутылках возможны его значительные потери. Например, если обезжиренное молоко хранить при освещении лампами дневного света при температуре 4 °C, то около 50% внесеного в молоко холекальциферола теряется в течение 12 сут. Пока не совсем ясно, связаны ли эти потери с прямым фотохимическим расщеплением и образованием активных форм кислорода (например, $^1O_2$), или они связаны с фотоиндуцированным окислением липидов. Как и другие ненасыщенные жирорастворимые компоненты пищи, витамин D склонен к окислительному разложению, но несмотря на это стабильность витамина D в пищевых продуктах, особенно в анаэробных условиях, сравнительно высока.

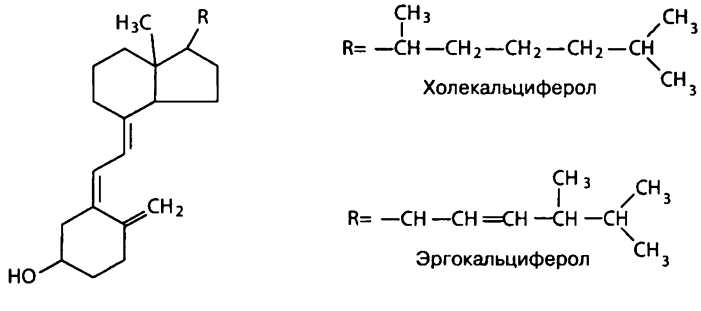


Рис. 7.8. Структурные формулы эргокальциферола (витамина D_2) и холекальциферола (витамина D_3).

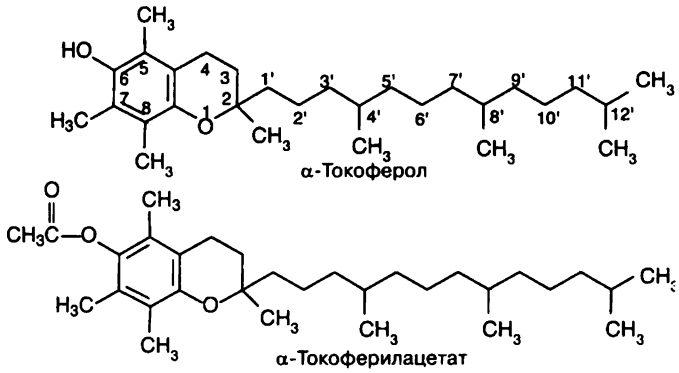
7.7.2.2. Методы анализа

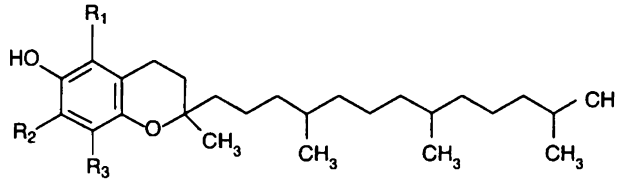
Для определения содержания витамина D преимущественно используют методы ВЭЖХ [147]. Поскольку в щелочных средах витамин D быстро разлагается, то реакцию омыления, часто применяемую при анализе жирорастворимых веществ, применять нельзя. Разработаны многочисленные методы очистки пищевых экстрактов перед проведением ВЭЖХ-анализа.

7.7.3. Витамин E

7.7.3.1. Строение и основные свойства

Витамин E — это группа токолов и токотриенолов с витаминной активностью, аналогичной α-токоферолу. Токолы представляют собой 2-метил-2(4′,8′,12′-триметилтридецил)хроман-6-олы, а в боковой цепи токо-





	R_1	R_2	R_3
α	CH_3	CH_3	CH_3
β	CH_3	H	CH_3
γ	H	CH_3	CH_3
δ	H	H	CH_3

Рис. 7.9. Структурные формулы токоферолов. Структура токотриенолов аналогична соответствующему токоферолу за исключением положений 3′, 7′ и 11′, в которых присутствуют двойные связи

триенолов (в отличие от токолов) в положениях 3′, 7′ и 11′ имеются двойные связи (рис. 7.9). В пищевых продуктах наиболее важными соединениями с активностью витамина Е являются токоферолы, которые представляют собой производные соответствующих токолов с одной и более метильными группами в положениях 5′,7′ или 8′ хроманолового кольца (см. рис. 7.9). α-, β-, γ- и δ-Формы токоферолов и токотриенолов отличаются числом и положением метильных групп и обладают различной витаминной активностью. Традиционные представления об относительной активности этих соединений приведены в табл. 7.11, из которой видно, что наибольшей активностью обладает α-токоферол [94]. Согласно более современным представлениям [71], специфической активностью витамина Е обладает только α-токоферол, а другие токоферолы (включая и α-токоферол) и токотриенолы характеризуются общими антиоксидантными свойствами. Единого мнения о связи витаминной активности со строением токоферолов в настоящее время нет.

В молекуле токоферола имеются три асимметрических атома углерода (в позициях 2′, 4′ и 8′, см. рис. 7.9), и витаминная активность соединений обусловлена пространственным расположением соседних к этим атомам групп. Следует отметить, что использовавшаяся ранее для обозначения соединений группы витамина Е номенклатура не отражала связи витаминной активности с пространственным строением. Обладающий наибольшей витаминной активностью природный стереоизомер α-токоферола следует обозначать как *RRR*-α-токоферол (обозначения типа *D*-α-токоферол применять не рекомендуется).

Синтетические формы α-токоферила ацетата широко используются для обогащения пищевых продуктов. Использование эфира существенно повышает стабильность соединения, поскольку блокирование фенольного гидроксила приводит к потере способности взаимодействовать с радикалами. Синтетические формы представляют собой рацемические смеси, состоящие из восьми возможных стереоизомеров, отличающихся расположением групп, соседних к атомам углерода 2′, 4′ и 8′. Эти смеси следует обозначать

Таблица 7.11

Традиционные представления об относительной витаминной активности токоферолов и токотриенолов [94]

Соединение	Биологические методы анализа			
	Рассасывание плода (крысы)	Гемолиз эритроцитов (крысы)	Мышечная дистрофия (цыплята)	Мышечная дистрофия (крысы)
α-Токоферол	100	100	100	100
β-Токоферол	25–40	15–27	12	
γ-Токоферол	1–11	3–20	5	11
δ-Токоферол	1	0,3–2		
α-Токотриенол	27–29	17–25		28
β-Токотриенол	5	1–5		

термином «полностью рацемический α-токоферила ацетат» (прежнее обозначение «*DL*-α-токоферила ацетат» применять не рекомендуется). Витаминная активность у различных форм токоферолов и токотриенолов разная (см. табл. 7.11) и зависит как от конкретной формы (α-, β-, γ-, δ-), так и от стереохимической природы боковой цепи токоферола (табл. 7.12) [152]. Витаминная активность полностью рацемического α-токоферила ацетата ниже, чем у природных *RRR*-изомеров, что необходимо учитывать при обогащении. Наиболее распространенной формой витамина Е в продуктах животного происхождения является α-токоферол, а другие токоферолы и токотриенолы в различных соотношениях присутствуют в продуктах растительного происхождения (табл. 7.13) [144, 148]. Было продемонстрировано, что увеличение содержания и активности витамина Е в растениях можно добиться методами генной инженерии, позволяющими ускорить синтез γ-токоферола и увеличить степень его превращения в α-токоферол [132].

Таблица 7.12

Витаминная активность изомерных форм α-токоферила ацетата [152].

Форма α-токоферила ацетата[a]	Относительная витаминная активность, %
RRR	100
Полностью рацемический	77
RRS	90
RSS	73
SSS	60
RSR	57
SRS	37
SRR	31
SSR	21

[a] Символы *R* и *S* указывают на соответственно хиральную конфигурацию 2,4' и 8' положений. Природной формой является форма *R*.

Таблица 7.13

Содержание токоферолов и токотриенолов в некоторых растительных маслах и других пищевых продуктах, мг/100 г [144, 148].

Пищевой продукт	α-Токоферол	α-Токотриенол	β-Токоферол	β-Токотриенол	γ-Токоферол	γ-Токотриенол	δ-Токоферол	δ-Токотриенол
Растительные масла, мг/100 г:								
подсолнечное	56,4	0,013	2,45	0,207	0,43	0,023	0,087	
арахисовое	14,1	0,007	0,396	0,394	13,1	0,03	0,922	
соевое	17,9	0,021	2,80	0,437	60,4	0,078	37,1	
хлопковое	40,3	0,002	0,196	0,87	38,3	0,089	0,457	
кукурузное	27,2	5,37	0,214	1,1	56,6	6,17	2,52	
оливковое	9,0	0,008	0,16	0,417	0,471	0,026	0,043	
пальмовое	9,1	5,19	0,153	0,4	0,84	13,2	0,002	
Детское питание (после омыления)	12,4		0,24		14,6		7,41	
Шпинат	26,05	9,14						
Говядина	2,24							
Пшеничная мука	8,2	1,7	4,0	16,4				
Ячмень	0,02	7,0		6,9		2,8		

Токоферолы и токотриенолы являются малополярными соединениями и присутствуют главным образом в жировом компоненте пищевых продуктов. Все неэтерифицированные токоферолы и токотриенолы способны действовать как антиоксиданты: они взаимодействуют со свободными радикалами с переносом H^+ фенольной группы и электрона на радикал. Токоферолы входят в состав всех биологических мембран и благодаря своим антиоксидантным свойствам повышают их стабильность. По той же причине природные токоферолы и токотриенолы способствуют также стабилизации ненасыщенных жирных кислот растительных масел. В отличие от них α-токоферила ацетат не обладает антиоксидантной активностью, так как его фенольная группа этерифицирована. Витаминная активность и проявляемые им *in vivo* антиоксидантные свойства возникают после расщепления эфирной связи под действием ферментов. Показано, что содержание витамина Е влияет на устойчивость к окислению мяса после убоя. Подверженность холестерола и других липидов свинины к окислению обратно пропорциональна потреблению α-токоферила ацетата животными.

7.7.3.2. Стабильность витамина Е и механизм его разложения

В отсутствие кислорода и окислителей соединения, обладающие активностью витамина Е, относительно стабильны. Анаэробные стадии при переработке пищевых продуктов, в частности термическая стерилизация при консервировании продуктов, мало влияют на активность витамина Е. В присутствии же кислорода скорость разложения витамина Е возрастает, особенно при наличии свободных радикалов. Скорость окислительного разложения обусловлена теми же факторами, которые влияют и на стабильность ненасыщенных жиров. Так, зависимости скорости разложения α-токоферола и ненасыщенных жиров от значения a_w аналогичны, причем минимальная скорость наблюдается при значении содержания влаги, соответствующей монослою, а при более высоких и более низких значениях a_w скорость разложения выше (см. главу 2). Переработка продукта с использованием окисления (например, отбеливание муки) может привести к существенным потерям витамина Е.

Одним из интересных примеров ненутритивного использования α-токоферола является добавление его при обработке бекона для снижения содержания в нем нитрозаминов. Считается, что α-токоферол (жирорастворимое фенольное соединение) служит ловушкой для азотсодержащих свободных радикалов ($NO^{\cdot}$ $NO_2^{\cdot}$), участвующих в процессах нитрозирования.

Превращения веществ, обладающих свойствами витамина Е, особенно α-токоферола, в пищевых продуктах изучены достаточно хорошо. На рис. 7.10 показано, как α-токоферол может реагировать с пероксильным радикалом (или другими радикалами) с образованием гидропероксида и радикала α-токоферила. Как и другие фенольные радикалы, последний обладает относительно малой реакционной способностью из-за делокализации неспаренного электрона по ароматическому кольцу. При обрыве радикальных реакций могут образовываться ковалентно связанные димеры и тримеры токоферила, а в ходе последующих окисления и перегруппировок образуются токофероксид, токоферила гидрохинон и токоферила хинон (рис. 7.10), а также другие продукты реакции. Несмотря на то что α-токоферила ацетат и другие эфиры со свойствами витамина Е не участвуют в тушении свободных радикалов, они подвергаются окислительному разложению, хотя и с меньшей скоростью, чем неэтерифицированные соединения. Продукты разложения витамина Е характеризуются низкой витаминной активностью или полным ее отсутствием. Благодаря способности действовать как фенольные антиоксиданты, неэтерифицированные соединения с активностью витамина Е способствуют повышению стабильности пищевых жиров.

Витамин Е способствует также повышению стабильности других веществ, конкурентно связывая по мере своего разложения синглетный кислород. Как показано на рис. 7.11, синглетный кислород атакует токоферольное кольцо с образованием промежуточного гидропероксидиенона, в результате перегруппировки которого образуются токоферила хинон и токоферила хинон-2,3-оксид, обладающие незначительной витаминной активностью. Скорость реакции различных форм токоферолов с синглетным кислородом убывает в последовательности $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, а их антиоксидантные свойства — в обратном направлении. Токоферолы способны также выступать в роли физических тушителей синглетного кислорода, то есть деактивировать его без собственного окисления. Именно этим объясняется тот факт, что токоферолы являются эффективными ингибиторами фотосенсибилизированного окисления соевого масла под действием синглетного кислорода.

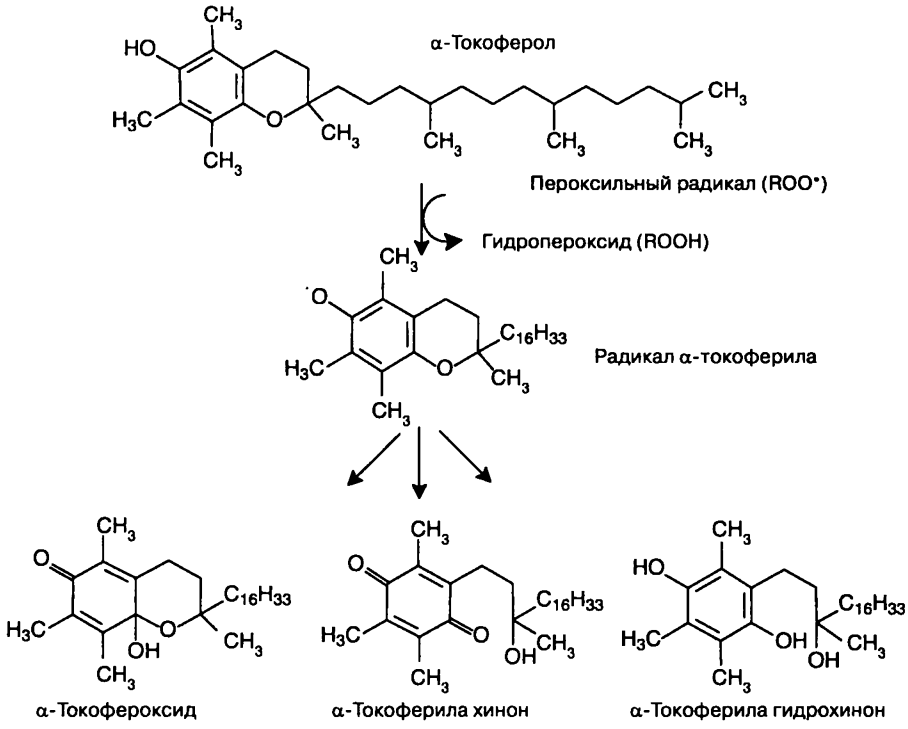


Рис. 7.10. Продукты окислительного разложения витамина Е. Помимо указанных первичных продуктов реакции, при последующих окислении и перегруппировках образуются и другие соединения

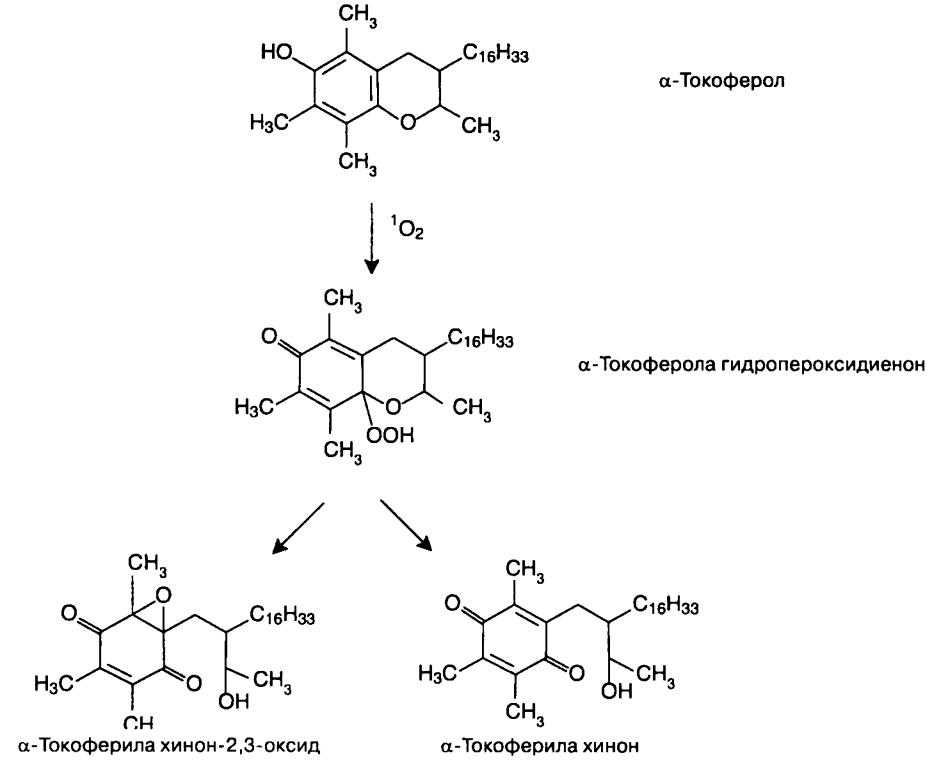


Рис. 7.11. Взаимодействие α-токоферола с синглетным кислородом

7.7.3.3. Биодоступность

Биодоступность соединений группы витамина Е достаточна высока у тех людей, в организме которых нормально перевариваются и усваиваются жиры. Биодоступность α-токоферила ацетата близка (по молям) биодоступности α-токоферола [16], за исключением употребления его в больших дозах (усвоение лимитировано стадией ферментативного гидролиза). Следует осторожно использовать ранее полученные данные о большей витаминной активности α-токоферила ацетата по сравнению с α-токоферолом, поскольку до проведения сравнительных экспериментов последний мог окислиться.

7.7.3.4. Методы анализа

В настоящее время применявшиеся ранее спектрофотометрический и прямой флуорометрический методы практически вытеснены методами ВЭЖХ. Высокоэффективная жидкостная хроматография позволяет определять содержание разных форм витамина Е (α-, β-, γ- и δ-токоферолов и токотриенолов) и, следовательно, зная витаминную активность каждой формы, можно адекватно оценить активность этого витамина в продукте в целом [22]. Детектирование проводят по поглощению в УФ- и видимой области спектра или по флуоресценции. Если для выделения витамина Е используют реакцию омыления липидов, то эфиры α-токоферола будут гидролизоваться до свободного α-токоферола. Все предварительные операции (экстракцию, омыление и др.) необходимо проводить так, чтобы предотвратить окисление витамина Е.

7.7.4. Витамин К

7.7.4.1. Структура и основные свойства

Витамин К — это группа нафтохинонов с терпеноидным заместителем в 3-положении или без заместителя (рис. 7.12). Незамещенная форма витамина К — это менадион, представляющий собой важнейшую синтетическую форму этого витамина, которая используется в БАД к пище и при обогащении пищевых продуктов. Филлохинон (витамин K_1) имеет растительное происхождение, а менахиноны с переменной длиной боковой цепи (витамин K_2) образуются в результате синтеза кишечной микробиотой. Филлохиноны в относительно больших количествах содержатся в листовых овощах — шпинате, кормовой, цветной и кочанной капусте, а в меньших количествах — в томатах и некоторых растительных маслах. Дефицит витамина К у здоровых людей встречается редко, поскольку потребление филлохинонов с пищей довольно велико, а менахиноны бактериального происхождения всасываются в толстой кишке. Этот дефицит может возникнуть при неэффективном всасывании или использовании фармакологических антикоагулянтов. Сообщалось, что ухудшить всасывание витамина К может потребление некоторых заменителей жира, но в умеренных количествах они мало влияют на усвоение витамина К.

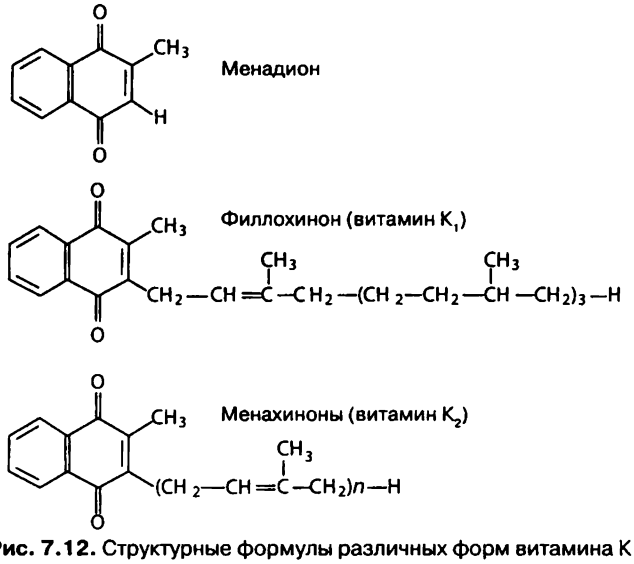


Рис. 7.12. Структурные формулы различных форм витамина К

Под действием некоторых восстановителей хинонная структура витамина К переходит в гидрохинонную форму, однако витаминная активность при этом сохраняется. Витамин К подвержен фотохимическому разложению, но при нагревании он стабилен.

7.7.4.2. Методы анализа

Спектрофотометрический и химические методы анализа, в которых используются окислительно-восстановительные реакции витамина, недостаточно специфичны для анализа пищевых продуктов. Удовлетворительной селективностью, позволяющей определять отдельные формы витамина К, обладают различные методы ВЭЖХ [147].

7.8. Водорастворимые витамины

7.8.1. Аскорбиновая кислота

7.8.1.1. Структура и основные свойства

L-Аскорбиновая кислота (*L*-АК) по строению сходна с углеводами (рис. 7.13). Ее кислотные и восстанавливающие свойства обусловлены наличием 2,3-ендиольного фрагмента. Это высокополярное соединение, хорошо растворимое в воде и плохо растворимое в неполярных растворителях. *L*-АК обладает кислотными свойствами: при 25 °С pK_{a1} = 4,04 (соответствует ионизации гидроксильной группы при атоме углерода С3), вторая pK_{a2} = 11,4 (соответствует ионизации гидроксильной группы при атоме углерода С2).

L-Аскорбиновая кислота содержит два оптически активных центра (в положении С4 и С5). *L*-Изоаскорбиновая кислота, оптический изомер С5, и *D*-АК, оптический изомер С4 (рис. 7.13), обладают теми же химическими свойствами, что и АК, но практически не обладают активностью витамина С. *L*-Изоаскорбиновая кислота (ее называют также эриторбовой кислотой) и АК благодаря их восстанавливающим и антиоксидантным свойствам широко используются в качестве пищевых ингредиентов, например при посоле мясных продуктов и для ингибирования ферментативных реакций, сопровождающихся потемнением овощей и фруктов, однако изоаскорбиновая кислота (а также *D*-АК) пищевой ценностью не обладают.

АК содержится в овощах и фруктах, в меньшей степени — в продуктах животного происхождения. В природе она встречается почти исключительно в восстановленной форме *L*-АК. Двухэлектронное окисление *L*-АК и диссоциация иона водорода приводят к образованию *L*-дегидроаскорбиновой кислоты (ДГАК), которая обладает почти той же витаминной активностью, что и АК, поскольку в организме она практически полностью восстанавливается до АК. Содержание ДГАК в пищевых продуктах почти всегда намного меньше, чем АК, и зависит от скоростей окисления аскорбата и гидролиза ДГАК до 2,3-дикетогулоновой кислоты. Дегидроаскорбатредуктаза и редуктаза свободных радикалов аскорбата активны в некоторых животных тканях. Считается, что эти ферменты за счет участия в окислительно-восстановительном (редокс-) цикле сохраняют этот витамин и поддерживают низкую концентарцию ДГАК. Сведения о высоких концентрациях ДГАК в пищевых продуктах и биологических материалах являются, по-видимому, аналитическим артефактом, возникшим вследствие окисления АК до ДГАК при подготовке образца и проведении анализа. Усложняет проведение анализа и нестабильность ДГАК.

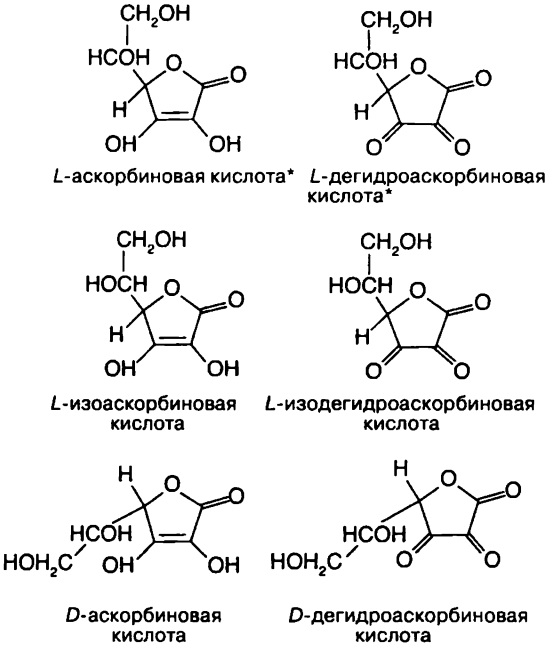


Рис. 7.13. Структурные формулы *L*-АК, *L*-ДГАК и их изомерных форм. Зведочка (*) обозначает наличие витаминной активности

АК можно вносить в пищевые продукты в виде недиссоциированной кислоты или ее нейтральных солей (аскорбат натрия, калия, кальция). Продукты конъюгации АК с гидрофобными соединениями становятся жирорастворимыми. Такие эфиры жирных кислот, как аскорбилпальмитат и ацетали АК (рис. 7.14) жирорастворимы и могут выступать в роли антиоксидантов в липидном окружении.

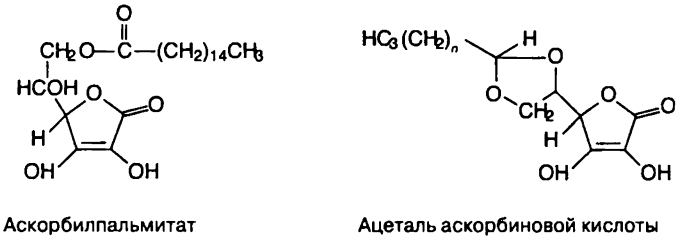


Рис. 7.14. Структурные формулы аскорбилпальмитата и ацеталей аскорбиновой кислоты

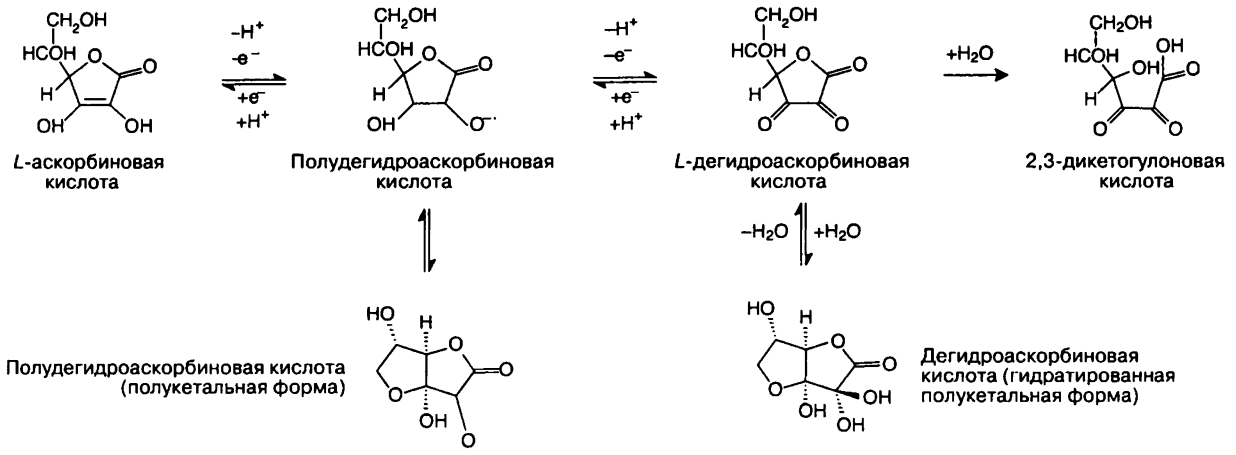


Рис. 7.15. Последовательное одноэлектронное окисление *L*-АК. Все соединения за исключением 2,3-дикетогулоновой кислоты обладают витаминной активностью

Окисление АК может включать либо две одноэлектронные стадии, либо одну двухэлектронную без образования интермедиата полудегидроаскорбата (рис. 7.15). При одноэлектронном окислении первая стадия сопровождается переносом электрона с образованием полудегидроаскорбата. Продуктом второй стадии является ДГАК — нестабильное соединение, очень склонное к необратимому гидролизу с образованием 2,3-дикетогулоновой кислоты (см. далее рис. 7.16), приводящему к утрате витаминной активности.

Окисление АК протекает очень легко, особенно в присутствии ионов металлов с переменной валентностью, в частности Cu^{2+} и Fe^{3+} Под воздействием тепла и света процесс окисления ускоряется, причем на него влияют также значение pH, концентрация кислорода и активность воды (значение a_w). Поскольку ДГАК легко гидролизуется, окисление до ДГАК чаще всего является существенной и зачастую скорость-лимитирующей стадией окислительного разложения витамина С.

Зачастую не учитывают, что при малых концентрациях АК и большом давлении кислорода АК действует как прооксидант. Это объясняется, по-видимому, аскорбатопосредованным образованием гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$) или других реакционноспособных групп. Вместе с тем существенной роли в пищевой химии это не играет.

7.8.1.2. Стабильность витамина С и процессы его разложения

7.8.1.2.1. Общие сведения

Поскольку аскорбиновая кислота очень хорошо растворима в воде, большие ее количества могут теряться из-за выделения из свеженарезанных или через поврежденную поверхность овощей и фруктов. На первой стадии химического разрушения АК происходит ее окисление до ДГАК, затем ее гидролиз до 2,3-дикетогулоновой кислоты и дальнейшее окисление, дегидратация и полимеризация с образованием ряда других, не обладающих витаминной ценностью продуктов реакции. Окисление и дегидратация протекают параллельно процессам дегидратации сахаров, в результате чего образуется большое число ненасыщенных и полимерных соединений (см. рис. 7.16).

Значительные потери аскорбиновой кислоты происходят также при хранении (в том числе в замороженном виде) и транспортировке продуктов. Например, потери содержания АК в промышленно расфасованных и замороженных зеленом горошке, шпинате, зеленостручковой фасоли и бамии в зависимости от времени хранения описываются уравнением первого порядка, а константа скорости меняется в области температур от −5 до −20 °С в соответствии с уравнением Аррениуса [46]. Установлено, что в этом температурном диапазоне наименее стабильна АК в шпинате ($t^{1/2}$= 8–155 сут), а наиболее стабильна — в бамии ($t^{1/2}$ = 40–660 сут). Это свидетельствует, что стабильность АК зависит как от состава продукта, так и от условий хранения, то есть скорость деградации АК, установленная для одного продукта, не может харак-

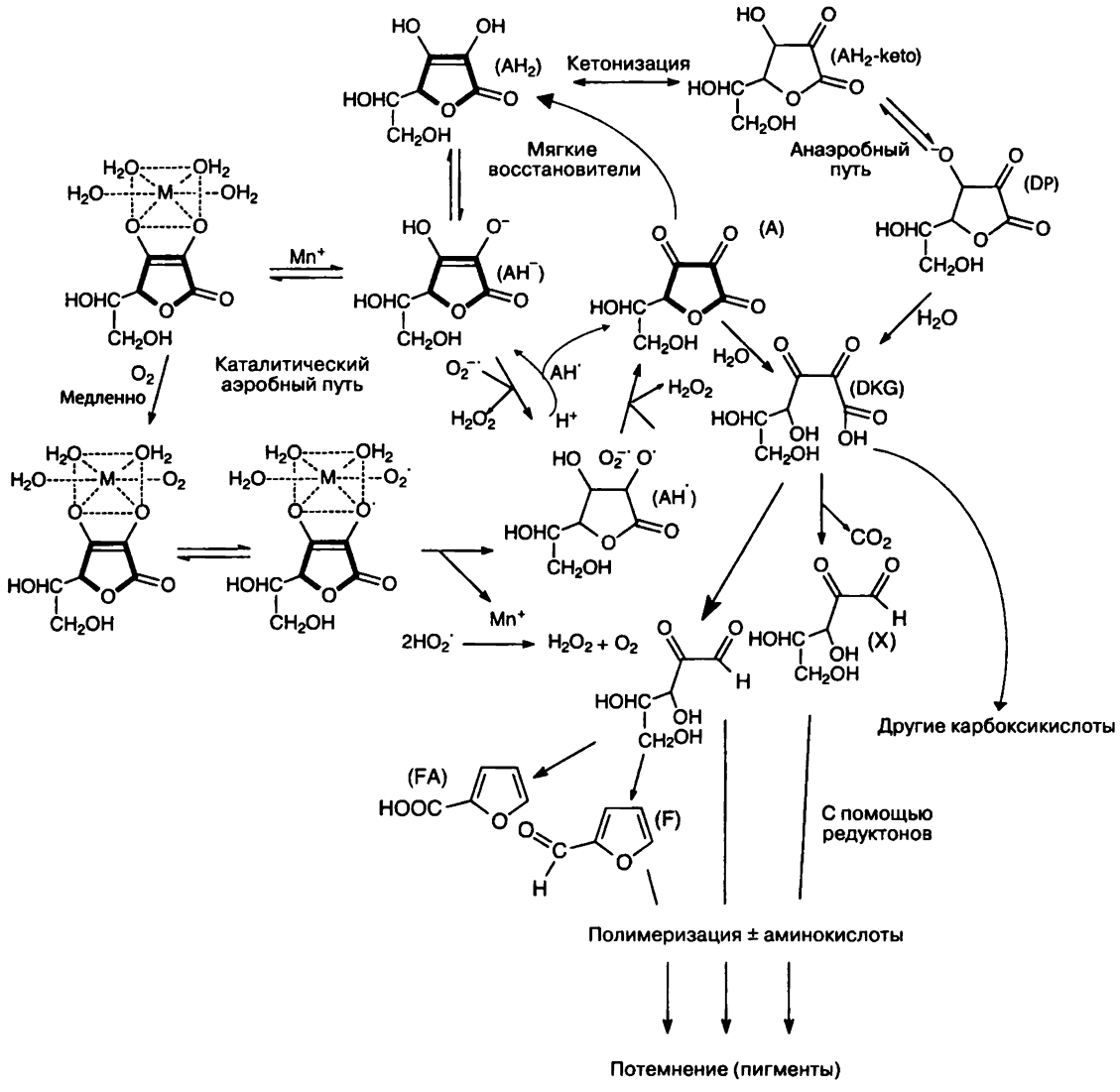


Рис. 7.16. Механизмы окислительного и анаэробного разрушения АК. Полужирными линиями обозначены соединения, обладающие активностью витамина С: AH_2 — полностью протонированная аскорбиновая кислота; AH^- — аскорбат-моноанион; $AH^{\cdot}$ — полудегидроаскорбат радикал; А — дегидроаскорбиновая кислота; FA — 2-фуроиновая кислота; F — 2-фуральдегид; DKG — 2,3-дикетогулоновая кислота; DP — 3-деоксипентозон; X — ксилозон; Mn^+ — ион металла-катализатора; $HO_2^{\cdot}$ – пергидроксильный радикал. По [13, 14, 79, 80, 90, 140]

теризовать скорость разрушения АК в другой пищевой системе, даже если различия в их составе весьма незначительны.

На взаимодействие АК с кислородом влияет степень ее протонирования, и поэтому скорость окислительного разложения витамина С нелинейно зависит от значения pH, возрастая в следующей последовательности: полностью протонированная аскорбиновая кислота (AH_2) < аскорбат-моноанион (AH^-) < < аскорбат-дианион (A^{2-}) [16].

При значениях pH, характерных для большинства пищевых продуктов, влияние кислотности на процесс окисления связано с изменением соотношения концентраций AH_2 и AH^- ионов ($pK_{a1} = 4{,}04$). При pH > 8 ($pK_{a2} = 11{,}4$) присутствие значительных количеств A^{2-} приводит к увеличению скорости окисления.

7.8.1.2.2. Каталитическое действие ионов металлов

Схема, приведенная на рис. 7.16, дает представление о влиянии ионов металлов и кислорода на процесс разложения АК. Скорость окислительной деградации АК линейно зависит от концентрации AH^-, молекулярного кислорода и ионов металла. Ранее считалось, что в нейтральной среде в отсутствие ионов металлов (то есть при «некатализируемой» реакции) процесс окисления АК протекает очень медленно, хотя и заметно. Так, константа скорости этой реакции составляет $k = 5{,}87\ \ 10^{-4}$/с. Однако позже было показано, что в насыщенных воздухом растворах при pH 7,0 АК окисляется намного медленнее (константа скорости окисления АК равна 6 10^{-7}/с [13]). Эти различия подтверждают, что спонтанное окисление очень незначительно и что основной вклад в процесс окисления АК вносят ионы микроэлементов, присутствующие в пищевом продукте или экспериментальном растворе. И действительно, константы скорости окисления в присутствии ионов металлов в концентрациях несколько мг/кг на несколько порядков выше, чем константа скорости реакции в отсутствие ионов металлов.

Скорость катализируемого ионами металлов окисления АК пропорциональна парциальному давлению растворенного кислорода в диапазоне давлений 1,0–0,4 атм и не зависит от концентрации кислорода при парциальном давлении $p < 0{,}20$ атм [79]. И наоборот, скорость окисления АК, катализируемого хелатными комплексами металлов, не зависит от концентрации кислорода [80].

Каталитическая активность ионов металлов зависит от конкретного металла, его степени окисления и присутствия хелирующих веществ. Показано, что ион Cu (II) примерно в 80 раз более активен, чем ион Fe (III), а хелатный комплекс Fe (III) и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) примерно в 4 раза более активен, чем свободное железо Fe (III) [13]. Уравнение скорости окисления общего аскорбата (ТА), зависящей от концентрации иона металла и константы $k_{кат}$ для иона металла, можно записать следующим образом:

$$-d\frac{[TA]}{dt} = k_{кат} \times [AH^-] \times [\text{Cu(II) или Fe(III)}],$$

где $[TA]$ = концентрация общего аскорбата = [АК] + [ДГАК]; $[AH^-]$ – концентрация AH^-

По этому уравнению можно оценить скорость разложения АК. В фосфатном буфере (pH 7,0) при температуре 20 °С константы $k_{кат}$ для Cu(II) и Fe(III) равны соответственно 880 и 42 $M^{-1} \cdot c^{-1}$. Следует отметить, что значения относительных и абсолютных констант скоростей каталитического окисления АК в простых растворах и реальных пищевых системах могут различаться из-за связывания ионов микроэлементов другими компонентами пищи (например, аминокислотами), а также участия этих ионов в других реакциях, некоторые из которых могут генерировать реакционноспособные свободные радикалы или активные формы кислорода (они могут ускорять окисление АК).

В отличие от Fe(III), окисление АК, катализируемое ионом Cu(II), в присутствии ЭДТА существенно замедляется [13]. Таким образом, невозможно точно предсказать влияние ЭДТА и других хелирующих веществ (в частности, цитрата и полифосфатов) на процесс окисления АК в пищевых продуктах.

7.8.1.2.3. Механизмы разрушения аскорбиновой кислоты

Механизм разрушения аскорбиновой кислоты может различаться в зависимости от природы пищевой системы и реакционной среды. Считается, что в процессе разложения АК, катализируемого ионами металла, образуется тройной комплекс, состоящий из аскорбат-моноаниона, O_2 и иона металла (рис. 7.16). При его распаде непосредственно образуется ДГАК без заметного образования продукта одноэлектронного окисления – полудегидроаскорбат-радикала. Распад АК может инициироваться также путем одноэлектронного окисления. В работе [14] показано, что существует много путей одноэлектронного окисления AH^- до $A^{-\cdot}$, а $A^{-\cdot}$ до ДГАК. Значения восстановительного потенциала, определяющего реакционную способность соединений, приведены в табл. 7.14, из которой видна взаимосвязь антиоксидантных свойств нескольких витаминов — аскорбиновой кислоты, α-токоферола и рибофлавина.

Потери витаминной активности в процессе окисления АК обусловлены гидролизом лактона ДГАК и образованием 2,3-дикетогулоновой кислоты. Щелочные условия благоприятствуют этому гидролизу. ДГАК наиболее стабильна при значениях pH 2,5–5,5 (при повышении pH ее стабильность снижается).

Таблица 7.14

Восстановительные потенциалы некоторых свободных радикалов и антиоксидантов. В верхней части таблицы приведены наиболее сильные окислители, а в нижней части — наиболее сильные восстановители. Каждая окисленная частица в редокс-паре способна принять электрон или атом водорода от любой ниже расположенной восстановленной частицы. По [14]

Пара[a]		$\Delta E^{0'}$, мВ
Окисленная форма	Восстановленная форма	
$HO^{\bullet}$, H^+	H_2O	2310
$RO^{\bullet}$, H^+	ROH	1600
$HO^{\bullet}_2$, H^+	H_2O_2	1060
$O_2^{-\bullet}$, $2H^+$	H_2O_2	940
RS	RS^-	920
$O_2(^1\Delta g)$	$O_2^{-\bullet}$	650
ПНЖК$^{\bullet}$, H^+	ПНЖК-Н	600
α-Токофероксил$^{\bullet}$, H^+	α-Токоферол	500
H_2O_2, H^+	H_2O, $OH^{\bullet}$	320
Аскорбат$^{-\bullet}$, H^+	Аскорбат-моноанион	282
Fe(III)ЭДТА	Fe(II) ЭДТА	120
Fe(III)вод.	Fe(II)вод.	110
Fe(III)цитрат	Fe(II)цитрат	Около 100
Дегидроаскорбат	Аскорбат$^{-\bullet}$	Около 100
Рибофлавин	Рибофлавин$^{-\bullet}$	−317
O_2	$O_2^{-\bullet}$	−330
O_2,H^+	$HO_2^{\bullet}$	−460

[a] *Обозначения:* аскорбат$^{-\bullet}$ — полудегидроаскорбат-радикал; ПНЖК$^{\bullet-}$ радикал полиненасыщенной жирной кислоты; ПНЖК-Н — полиненасыщенная жирная кислота с *бис*-аллильным Н; $RO^{\bullet}$ — алифатический алкоксирадикал; $\Delta E^{0'}$ — стандартный одноэлектронный восстановительный потенциал, мВ.

Так, периоды полураспада ДГАК при температуре 23 °С и pH 7,2 и 6,6 равны соответственно 100 и 230 мин [10]. Скорость гидролиза ДГАК существенно возрастает с повышением температуры, но не зависит от присутствия или отсутствия кислорода. Принимая во внимание лабильность ДГАК в нейтральной среде, к выводам о значительном содержании *L*-дегидроаскорбиновой кислоты в пищевых продуктах следует относиться осторожно, поскольку оно может быть обусловлено неконтролируемым окислением в ходе анализа.

Несмотря на то что процесс окисления АК довольно точно объясняется через образование промежуточного тройного комплекса [79], более поздние исследования расширили наши представления о механизмах окисления. В работе [127] было показано, в частности, что стадией, определяющей скорость окисления аскорбат-моноаниона, катализируемого ионами металла, является образование супероксид-аниона:

$$AH^- + O_2 \xrightarrow{\text{катализатор}} AH^{\cdot} + O_2^{-\cdot}$$

Супероксид участвует и в последующих стадиях, повышая тем самым общую скорость окисления аскорбата до дегидроаскорбата (А) в 2 раза:

$$AH^- + O_2^{-\cdot} \xrightarrow{2H^+} AH^{\cdot} + H_2O_2$$

$$AH^{\cdot} + O_2^{-\cdot} \xrightarrow{H^+} A + H_2O_2$$

Может происходить также обрыв реакции при взаимодействии двух аскорбат-радикалов (см. рис. 7.16):

$$2AH^{\cdot} \xrightarrow{-H^+} A + AH^-$$

Вклад анаэробной деградации АК (см. рис. 7.16) в общий процесс ее распада в большинстве пищевых продуктов незначителен. Ее роль возрастает лишь после исчезновения остаточного кислорода в консервированных продуктах (например, в овощах, томатах и фруктовых соках), однако и в этом случае анаэробное разложение АК протекает очень медленно. Любопытно, что оно является доминирующим при хранении дегидратированного томатного сока независимо от присутствия кислорода. Было показано, что в этом случае определяющую роль играет анаэробное разложение, катализируемое ионами микроэлементов, и его скорость пропорциональна концентрации Cu(II).

Механизм анаэробного разложения АК до конца не ясен. По-видимому, он включает стадию распада 1,4-лактонного мостика *без* предварительного окисления до ДГАК (при этом распадается кетоформа АК, рис. 7.16). В отличие от аэробного разложения, наибольшая скорость анаэробного распада характерна для значения pH около 3–4. Такая зависимость обусловлена влиянием pH на процесс открытия лактонного кольца и концентрацию моноанионов аскорбата.

Сложность механизма анаэробного разложения и влияние состава пищевого продукта объясняют значительное изменение энергии активации распада витамина С в процессе хранения апельсинового сока при температуре 28 °С. И наоборот, энергия активации процесса разложения витамина С при хранении консервированного грейпфрутового сока не зависит от температуры в интервале от 4 до 50 °С, что свидетельствует о постоянстве механизма реакции в этих условиях [105]. Причины различного поведения витамина С в таких похожих продуктах не ясны.

Поскольку в упаковках с консервированными продуктами почти всегда содержится остаточный кислород, АК в них разлагается как анаэробно, так и аэробно, причем константы аэробного разрушения на 2–3 порядка выше анаэробного.

7.8.1.2.4. Продукты разложения аскорбиновой кислоты

Независимо от механизма разложения АК открытие лактонного кольца приводит к необратимой потере активности витамина С. Несмотря на то что конечные стадии разложения аскорбата не оказывают существенного влияния на пищевую ценность, они, тем не менее, играют немаловажную роль в образовании вкусоароматических соединений и в процессах неферментативного потемнения.

В настоящее время идентифицировано более 50 низкомолекулярных продуктов распада аскорбиновой кислоты, природа и концентрация которых существенно зависят от температуры, значений pH и a_w, содержания кислорода и ионов металлов, а также от присутствия реакционноспособных форм кислорода. Все продукты разложения АК можно разделить на три типа:

полимерные промежуточные продукты;

ненасыщенные карбоновые кислоты с 5-ю или 6-ю атомами углерода;

продукты фрагментации с числом атомов углерода, равным или меньшим 5.

Установлено, что при термическом разложении АК в нейтральной среде образуется формальдегид. Некоторые продукты распада определяют изменения вкуса и аромата цитрусовых соков в процессе их хранении и переработки.

Процессы разложения АК и сахаров очень сходны, а в некоторых случаях механизмы этих реакций идентичны. Процессы аэробного и анаэробного разложения АК имеют определенные качественные различия, но и в том, и в другом случае существенную роль играет значение pH. Основными продуктами разложения АК в нейтральных и кислых растворах являются *L*-ксилозон, щавелевая, *L*-треониновая и винная кислоты, 2-фуральдегид (фурфураль) и фуроиновая кислота, а также ряд карбонильных и других ненасыщенных соединений. Как и в случае сахаров, в щелочных средах степень фрагментации увеличивается.

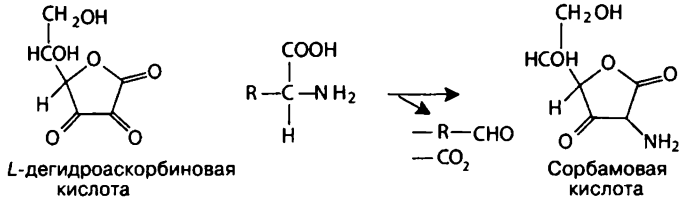


Рис. 7.17. Участие ДГАК в реакции Штрекера

Распад АК обычно ассоциируется с обесцвечиванием (как в присутствии, так и в отсутствие аминов). ДГАК, как и образующиеся при ее распаде дикарбонилы, могут реагировать с аминокислотами (реакция Штрекера). Продукт этой реакции (сорбамовая кислота, рис. 7.17) может образовывать ди-, три- и те-

трамеры, часть из которых имеет красноватый или желтоватый цвет [13, 14, 79, 80, 90, 140]. Кроме того, светло-коричневый цвет имеет 3,4-дигидрокси-5-метил-2(5H)-фуран — промежуточный продукт дегидратации после декарбоксилирования в процессе анаэробного разложения АК. Дальнейшая полимеризация этих и других ненасыщенных соединений приводит к образованию меланоидинов (азотсодержащих полимеров) или не содержащих азота карамелеподобных пигментов. Хотя неферментативное потемнение цитрусовых соков и других аналогичных напитков является весьма сложным процессом, непосредственное участие в нем принимает аскорбиновая кислота [74].

7.8.1.2.5. Влияние других внешних факторов

Помимо факторов, влияющих на стабильность аскорбата (см. выше), на сохранение этого витамина в пищевых продуктах оказывают влияние и другие внешние факторы. Как и другие водорастворимые соединения, АК в сухих пищевых системах (например, в зерновых завтраках) быстрее разлагается при повышении значения a_w в интервале от 0,10 до 0,65 [29, 75, 86] (рис. 7.18). По-видимому, это обусловлено повышением способности воды выступать в качестве растворителя реагентов и катализаторов. В присутствии некоторых сахаров (кетосахаров) скорость анаэробного разложения АК может возрастать. Аналогичное влияние при низких значения pH оказывает сахароза, поскольку в этих условиях из нее образуется фруктоза. И наоборот, некоторые сахара и сахарные спирты (полиолы) ингибируют аэробное разложение АК (возможно, за счет связывания ионов металлов и снижения их каталитической активности). Обратный эффект фоточувствительных агентов на сохранность АК обусловлен образованием синглетного кислорода. Значимость этих факторов для пищевой химии предстоит определить.

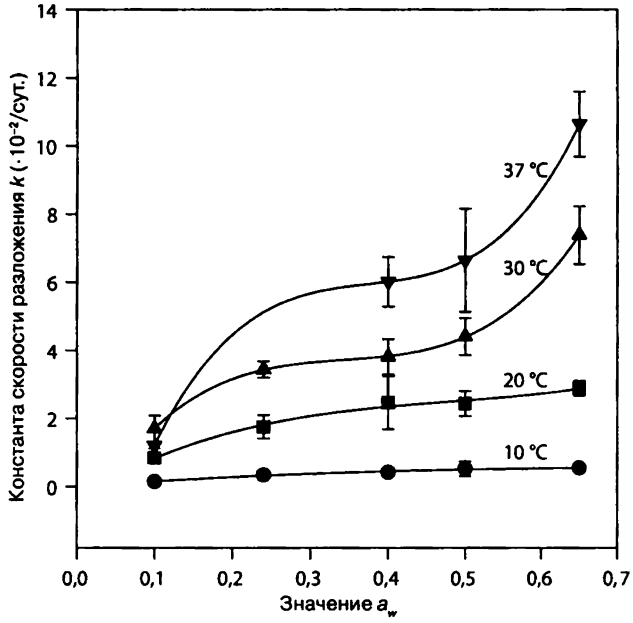


Рис. 7.18. Зависимость кажущихся констант скорости реакции 1-го порядка разложения аскорбиновой кислоты (АК + ДГАК) в дегидратированных пищевых системах, моделирующих зерновые завтраки, от температуры и значения a_w. По [82]

7.8.1.3. Функции аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах

Помимо того, что аскорбиновая кислота является эссенциальным нутриентом, АК широко используется в качестве пищевой добавки (ингредиента) благодаря ее восстановительным и антиоксидантным свойствам. Как мы уже отмечали, АК эффективно ингибирует процессы ферментативного потемнения (преимущественно за счет восстановления о-хинонов). Среди других функций следует выделить:

- восстановительное действие в хлебопекарных улучшителях;
- защиту некоторых склонных к окислению соединений (например, фолатов) благодаря взаимодействию со свободными радикалами и кислородом;
- ингибирование образования нитрозаминов в мясных продуктах;
- восстановление ионов металлов.

Антиоксидантная роль АК реализуется посредством ряда механизмов. Аскорбат ингибирует автоокисление липидов несколькими способами [14, 90, 133]:

- улавливая синглетный кислород;
- восстанавливая кислородные и углеродные радикалы с образованием менее реакционноспособного радикала полудегидроаскорбата или ДГАК;

преимущественное окисление аскорбата и, тем самым, снижение концентрации кислорода;

регенерируя другие антиоксиданты (например, восстанавливая радикал токоферола).

АК, будучи очень полярным соединением, практически нерастворима в жирах. Тем более удивительно, что диспергированная в жирах и содержащаяся в эмульсиях АК является эффективным антиоксидантом [43]. Особенно эффективно действует сочетание АК + α-токоферол в пищевых системах с объемной жировой фазой, тогда как сочетание α-токоферола с липофильным аскорбилпальмитатом лучше действует в эмульсиях типа «масло-в-воде». Показано, что при использовании аскорбилпальмитата в смеси с α-токоферолом и другими фенольными антиоксидантами наблюдается синергизм.

7.8.1.4. Усвояемость

Основными пищевыми источниками АК являются фрукты, овощи, соки и обогащенные ею продукты, в том числе зерновые завтраки. Усвояемость АК из готовой к употреблению капусты брокколи, апельсинов и апельсинового сока эквивалентна усвояемости из витаминно-минеральных таблетированных комплексов [96]. Усвояемость АК из сырой капусты брокколи на 20% ниже, чем из приготовленной, что может быть обусловлено неполным разрушением клеток при разжевывании и переваривании. Приведенные данные свидетельствуют, что различия в усвояемости АК из сырых овощей и приготовленных из них блюд малозначимы. Следует лишь особо отметить, что содержащаяся в большинстве фруктов и овощей аскорбиновая кислота усваивается человеком очень легко [49, 71].

7.8.1.5. Методы анализа

Существует много способов определения содержания аскорбиновой кислоты в пищевых продуктах, и для каждого конкретного случая следует подбирать наиболее подходящий метод [108]. АК интенсивно поглощает свет в УФ-диапазоне (λ_{max} ~ 245 нм), однако ее спектрофотометрическое определение затрудняется присутствием в пище других хромофорных компонентов. ДГАК слабо поглощает свет (λ_{max} ~ 300 нм). Традиционным аналитическим методом является окислительно-восстановительное титрование раствора, содержащего АК, красителем 2,6-дихлорфенолиндофенолом, в ходе которого АК восстанавливает его до обесцвечивания. Определению АК этим методом мешает присутствие других восстановителей; еще одним его недостатком является невозможность измерения содержания ДГАК. Проведение анализа до и после насыщения раствора сероводородом или обработки тиоловыми реагентами (с целью восстановления ДГАК в АК) дает возможность определить общее содержание АК + ДГАК. К сожалению, содержание ДГАК определяется недостаточно точно — лишь по разнице результатов двух измерений.

Иной подход заключается в конденсации ДГАК, получаемой при контролируемом окислении *L*-АК в образце, с различными карбонильными соединениями. Так, при взаимодействии с фенилгидразином получается аскорбил-*бис*-фенилгидразон, концентрацию которого можно определить спектрофотометрически, после чего рассчитать содержание *L*-АК, однако этому определению мешают карбонильные соединения, присутствующие в пище. Можно использовать также реакцию ДГАК с *о*-фенилендиамином, в результате которой образуется интенсивно флуоресцирующий трициклический продукт конденсации. Будучи более специфичным и чувствительным, чем определение с фенилгидразином, этот метод в присутствии некоторых дикарбонилов дает ошибочные результаты. Определению витамина С с использованием окислительно-восстановительного титрования или реакций конденсации с карбонильными соединениями мешает присутствие в продуктах изоаскорбиновой кислоты, не обладающей витаминной активностью.

Существует также много точных и чувствительных ВЭЖХ-методов, позволяющих определить общее содержание АК (до и после обработки раствором восстановителя). Некоторые ВЭЖХ-методы дают возможность непосредственно измерить концентрацию *L*-АК и ДГАК. Сочетание хроматографического разделения со спектрофотометрическим, флуорометрическим или электрохимическим детектированием делает ВЭЖХ-анализ намного более специфичным, чем традиционные окислительно-восстановительные методы. Методами ВЭЖХ можно одновременно определить содержание аскорбиновой и изоаскорбиновой кислот и их дегидроформ [146]. Предложен также метод анализа с использованием газовой хроматографии и масс-спектрометрии [31], но его недостатком является необходимость длительной подготовки образцов.

7.8.2. Тиамин

7.8.2.1. Структура и общие свойства

Тиамин представляет собой замещенный пиримидин, связанный метиленовым мостиком (—CH_2—) с замещенным тиазолом (рис. 7.19) [82]. Тиамин широко распространен в растительных и животных тканях. Преимущественно он встречается в форме тиаминпирофосфата и в меньшей степени — в форме нефосфорилированного тиамина, тиаминмонофосфата и тиаминтрифосфата. Тиаминпирофосфат представляет собой кофермент различных дегидрогеназ α-кетокислот, декарбоксилаз α-кетокислот, фосфокетолаз и транскетолаз. Для обогащения пищевых продуктов используют промышленно выпускаемые формы тиамина — тиамина гидрохлорид и тиамина мононитрат (рис. 7.19).

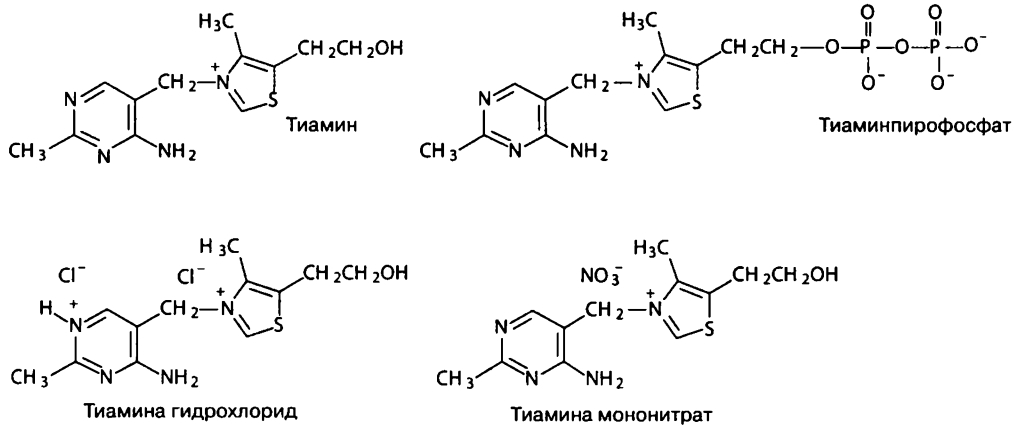


Рис. 7.19. Структурные формулы различных форм тиамина, обладающих активностью витамина B_1

Тиамин обладает необычными кислотно-щелочными свойствами. Значение pK_{a1} (около 4,8) соответствует диссоциации протонированного пиримидина N^1 с образованием незаряженного пиримидильного фрагмента свободного тиаминового основания (рис. 7.20). Кажущееся значение pK_{a2} (около 9,2) в области щелочных значений pH соответствует присоединению двух эквивалентов основания и возникновению тиаминового псевдооснования. Затем тиазольное кольцо открывается и образуется тиольная форма тиамина (рис. 7.20). Еще одной особенностью свободного тиаминового основания является присутствие в тиазольном кольце четвертичного азота, остающегося положительно заряженным при любом значении pH. Выраженная зависимость разложения тиамина от значения pH отражает происходящие при этом изменения ионных и структурных форм. Протонированный тиамин значительно более стабилен, чем свободное основание, псевдооснование и тиольная форма. Именно этим объясняется высокая стабильность тиамина в кислых средах (табл. 7.15) [104]. В то же время стабильность тиамина в нейтральных и щелочных средах одна из самых низких среди всех витаминов, и наоборот, тиамин относительно стабилен на свету и в присутствии окислителей.

Таблица 7.15

Сравнение стабильности тиамина и тиаминпирофосфата в 0,1 М фосфатном буфере при различных значениях pH и температуре 265 °С. По [104]

pH раствора	Тиамин		Тиаминпирофосфат	
	k, мин$^{-1}$	$t^{1/2}$, мин	k, мин$^{-1}$	$t^{1/2}$, мин
4,5	0,0230	30,1	0,0260	26,6
5,0	0,0215	32,2	0,0236	29,4
5,5	0,0214	32,4	0,0358	19,4
6,0	0,0303	22,9	0,0831	8,33
6,5	0,0640	10,8	0,1985	3,49

Обозначения: k — константа скорости первого порядка, $t^{1/2}$ — период полураспада.

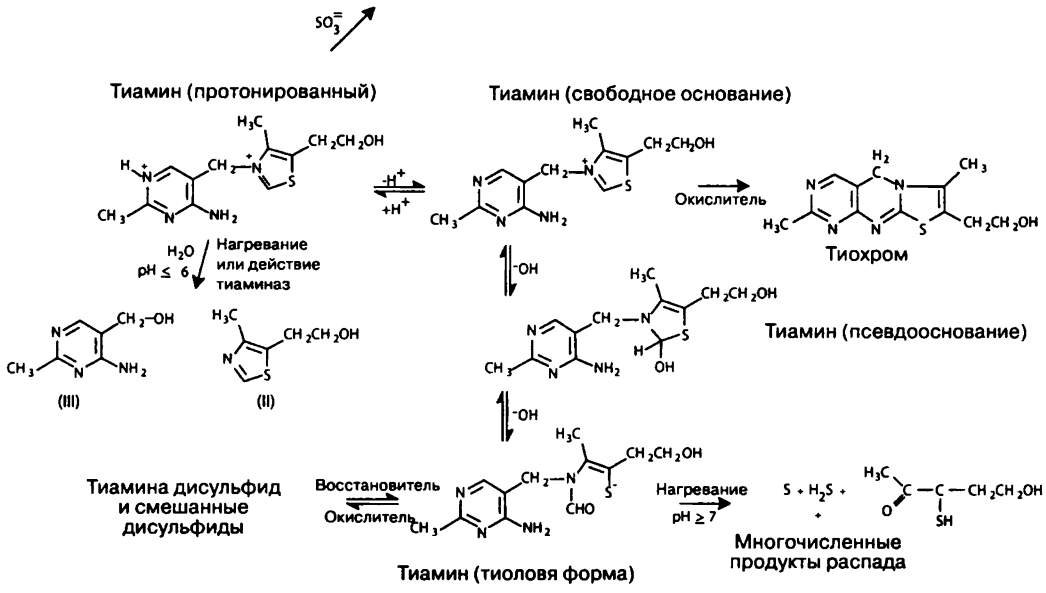


Рис. 7.20. Основные пути ионизации и разложения тиамина. По [19а, 36, 140]

7.8.2.2. Стабильность тиамина и процессы разложения

7.8.2.2.1. Стабильность

О стабильности тиамина в пищевых продуктах известно достаточно много [40, 98]. Систематическими исследованиями показано [140], что большие потери этого витамина (табл. 7.16) [98] возможны, если: 1) имеются условия для его перехода в окружающую водную среду; 2) значение pH ≥7; 3) присутствует сульфитирующий агент. Потери тиамина наблюдаются также при хранении продуктов с высоким содержанием влаги при комнатной и (особенно) при повышенных температурах (табл. 7.17) [44]. Скорость разложения тиамина в пищевых продуктах практически всегда описывается уравнением первого порядка. Процесс разложения может проходить несколькими путями. Наблюдающаяся нелинейность зависимости потерь тиамина в ряде пищевых продуктов от температуры (кривая Аррениуса) является следствием его одновременного разложения посредством разных механизмов.

Тиамин очень стабилен при комнатной температуре и низком значениии a_w. Известно, что в системах, моделирующих сухие зерновые завтраки, тиамин практически не разлагается при температуре ниже 37 °C и значениях a_w 0,1–0,65 (рис. 7.21) [19а, 36, 140]. При более высокой температуре (45 °C), особенно при $a_w \geq 0{,}4$ (превышающей величину мономолекулярной a_w, около 0,24), наблюдается заметное разложение тиамина. Наиболее высокая скорость распада тиамина в этих модельных системах при a_w 0,5–0,65 (рис. 7.22) [30]. При повышении значения a_w с 0,65 до 0,85 скорость разложения тиамина снижается [5].

Невысокую стабильность тиамина в рыбе и ракообразных после вылова довольно долго объясняли действием тиаминаз, однако, по меньшей мере, часть тиамина разлагается в ходе неэнзиматических реакций, катализируемых гемсодержащими белками — миоглобином и гемоглобином [113]. Присутствие разлагающих тиамин гемсодержащих белков в мясе тунца, свинине и говядине предполагает, что денатурированный миоглобин может быть вовлечен в процесс разложения тиамина при переработке и хранении пищевых продуктов. По-видимому, модифицирующие тиамин неферментативные реакции не приводят к распаду молекулы тиамина, как при обычных процессах разложения. Можно предположить, что анти-

Таблица 7.16

Скорость деградации тиамина (период полураспада при температуре 100 °С) и энергия активации разложения тиамина при тепловой обработке пищевых продуктов. По [98]

Пищевая система	Значение pH	Диапазон температур, °С	Период полураспада, ч	Энергия активации, кДж/моль
Пюре из говяжьего сердца	6,10	109–149	4	120
Пюре из говяжьей печени	6,18	109–149	4	120
Пюре из ягнятины	6,18	109–149	4	120
Пюре из свинины	6,18	109–149	5	110
Мясной фарш	Нет данных	109–149	4	110
Пюре из говядины	Нет данных	70–98	9	110
Цельное молоко	Нет данных	121–138	5	110
Пюре из моркови	6,13	120–150	6	120
Пюре из зеленостручковой фасоли	5,83	109–149	6	120
Гороховое пюре	6,75	109–149	6	120
Пюре из шпината	6,70	109–149	4	120
Гороховое пюре	Нет данных	121–138	9	110
Пюре из консервированного горошка	Нет данных	121–138	8	110
Консервированный горошек	Нет данных	104–133	6	84

Значение a_w 0,98–0,99. Значения периода полураспада и энергии активации округлены до целых значений.

Таблица 7.17

Типичные потери тиамина при хранении консервированных продуктов. По [44]

Продукт	Содержание тиамина через 12 мес. хранения, %, при температуре	
	38 °С	1,5 °С
Абрикосы	35	72
Зеленостручковая фасоль	8	76
Лимская фасоль	48	92
Томатный сок	60	100
Зеленый горошек	68	100
Апельсиновый сок	78	100

тиаминовый компонент внутренностей рыб, ранее считавшийся тиаминазой, на самом деле является термостойким и, возможно, неферментным катализатором.

На разложение тиамина влияют и другие компоненты пищи. Его могут инактивировать таннины, превращая тиамин в биологически неактивные аддукты. Могут взаимодействовать с тиамином и различные флавоноиды, однако продуктом этой окислительной реакции флавоноидов в присутствии тиамина является тиаминдисульфид, обладающий витаминной активностью. Белки и углеводы способны уменьшать скорость разложения тиамина при нагревании или в присутствии бисульфита, но степень их влияния в сложных пищевых системах предсказать довольно трудно. Частично стабилизирующий эффект белков обусловлен образованием смеси дисульфидов с тиольной формой тиамина — реакцией, замедляющей дальнейшее разложение тиамина. Хлор (в виде гипохлорит-иона) при концентрациях, близких к его концентрации в воде, используемой для приготовления, вызывает быстрое разложение тиамина, механизм которого, по-видимому, аналогичен механизму разложения тиамина при повышенных температурах в кислых средах.

Затрудняет оценку и прогнозирование сохранности тиамина разная зависимость стабильности свободного тиамина и его основной природной формы (тиаминпирофосфата) от значения pH. Если при pH 4,5 скорость разложения обеих форм почти одинаковы, то при pH 6,5 тиаминпирофосфат разлагается почти в три раза быстрее (см. табл. 7.15).

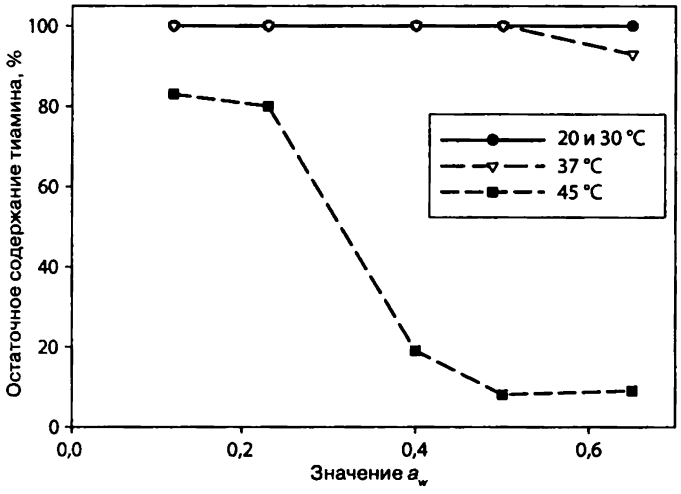


Рис. 7.21. Влияние значения a_w и температуры на стабильность тиамина в дегидратированных пищевых системах, моделирующих сухие зерновые завтраки (процент сохранности тиамина через 8 мес. хранения). По [30]

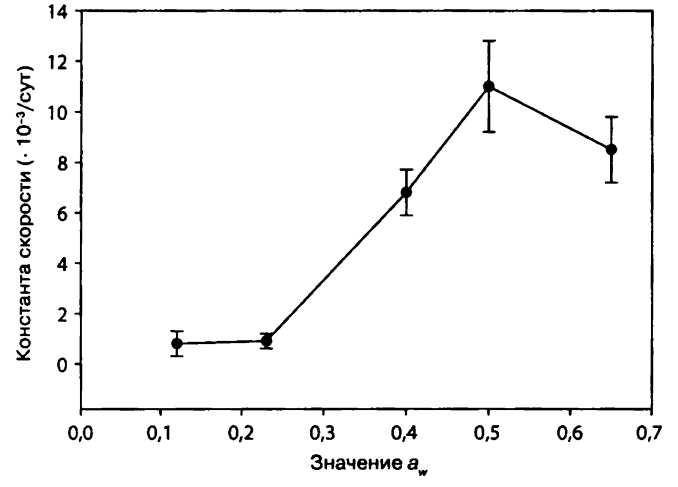


Рис. 7.22. Влияние значения a_w на константы первого порядка скорости разложения тиамина в дегидратированных пищевых системах, моделирующих сухие зерновые завтраки, при температуре хранения 45 °С. По [30]

Значительны различия в стабильности двух синтетических форм тиамина — гидрохлорида и мононитрата. Поскольку растворимость гидрохлорида выше, для обогащения жидких продуктов его использование более предпочтительно. Из-за различий в энергиях активации мононитрат имеет большую стабильность при температурах ниже 95 °С, а гидрохлорид — при температурах 95–110 °С (табл. 7.18) [87].

7.8.2.2.2. Механизмы разложения

Несмотря на то что скорость и механизм разложения тиамина при повышенных температурах существенно зависят от значения pH среды, расщепление молекулы обычно происходит по центральному метиленовому мостику. В кислых средах (pH < 6) терморазложение тиамина протекает медленно и включает разрыв метиленового мостика с образованием пиримидинового и тиазольного фрагментов (преимущественно в незаряженной форме). При значениях pH 6–7 распад тиамина ускоряется с повышением степени фрагментации тиазольного кольца, а при pH 8 у продуктов разложения уже не обнаруживается неповрежденного тиазольного кольца. Распад тиамина вследствие фрагментации и перегруппировки тиазольного кольца приводит к образованию целой группы серосодержащих продуктов, которые влияют на вкус и запах мяса. Считается, что продукты фрагментации тиазола при значениях pH > 6 образуются из небольших количеств тиамина в форме тиола или псевдооснования.

В присутствии бисульфит-ионов тиамин быстро разлагается, из-за чего добавление сульфитирующих агентов в пищевые продукты, являющиеся важными источниками тиамина, запрещено федеральными нормативными актами США. Распад тиамина под действием бисульфита аналогичен его разложению при значениях pH < 6 (см. рис. 7.20) за исключением образования пиримидина сульфоната. Реакция с бисульфитом представляет собой обмен основаниями или нуклеофильное замещение при метиленовом углероде, то есть бисульфит-ион занимает место тиазола. Могут ли другие нуклеофилы, входящие в состав пищевых продуктов, действовать аналогично бисульфиту, до конца не ясно. Разложение тиамина в присутствии бисульфита происходит в широком диапазоне pH, причем максимальная скорость наблюдается при pH около 6 [161]. Колоколообразная зависимость скорости реакции от значения pH объясняется тем, что сульфит-ион преимущественно реагирует с протонированной формой тиамина.

В нескольких исследованиях отмечено сходство условий (в частности, значений pH и a_w), благоприятствующих разложению тиамина и протеканию реакции Майяра. Тиамин с первичной аминогруппой в пиримидильном фрагменте быстрее всего разлагается при средних значениях a_w, а также в нейтральных и щелочных условиях. В более ранних исследованиях была выявлена способность тиамина при определен-

Таблица 7.18

Кинетические параметры процесса разложения тиамина в тесте из пшеничной муки крупного помола при высоких температурах. По [87]

Значение a_w	Температура, °С	$k \cdot 10^4$/мин ± 95%-ный доверительный интервал	Период полураспада, мин	Энергия активации, ккал/моль
Гидрохлорид				
0,58	75	3,72 ± 0,01	1863	95,4
	85	11,41 ±3,64	607	
	95	22,45 ± 2,57	309	
0,86	75	5,35 ± 2,57	1295	92,1
	85	12,20 ± 4,45	568	
	95	30,45 ± 8,91	228	
Мононитрат				
0,58	75	2,88 ± 0,01	2406	109
	85	7,91 ±0,01	876	
	95	22,69 ± 2,57	305	
0,86	75	2,94 ± 0,01	2357	111
	85	8,31 ±0,01	834	
	95	23,89 ± 0,01	290	

ных условиях вступать в реакции с сахарами, но сахара зачастую могут стабилизировать тиамин. Несмотря на указанное сходство условий протекания разложения тиамина и реакции потемнения Майяра, непосредственное взаимодействие тиамина с исходными или промежуточными продуктами реакции Майяра в пищевых продуктах маловероятно.

7.8.2.3. Усвояемость

Несмотря на неполноту имеющихся данных, тиамин из большинства исследованных пищевых продуктов, судя по всему, утилизируется практически полностью [52, 70]. Как уже отмечалось выше, образование тиамина дисульфида и его смешанных дисульфидов мало влияет на усвояемость этого витамина. Эксперименты на животных показали, что активность тиамина дисульфида составляет 90% от таковой тиамина.

7.8.2.4. Методы анализа

Несмотря на наличие микробиологических методов определения тиамина, основными по-прежнему остаются флуорометрический и ВЭЖХ-методы [41]. Тиамин обычно экстрагируют из пищевого продукта нагреванием (например, автоклавированием) гомогената в разбавленной кислоте. При определении содержания общего тиамина фосфорилированные формы этого витамина гидролизуют фосфатазой в буферном растворе, хроматографически удаляют флуоресцирующие примеси, путем обработки окислителем переводят тиамин в интенсивно флуоресцирующий тиохром (см. рис. 7.20) и определяют его концентрацию.

Общее содержание тиамина можно определить методом ВЭЖХ после обработки фосфатазой. Флуорометрический ВЭЖХ-анализ применяют после перевода тиамина в тиохром или проводя постколоночное окисление до тиохрома с последующей флуориметрической детекцией. Метод ВЭЖХ позволяет одновременно определять также и фосфатные эфиры тиамина.

7.8.3. Рибофлавин

7.8.3.1. Структура и общие свойства

Понятия и термины «рибофлавин» или «витамин B_2» объединяют группу соединений, обладающих биологической активностью рибофлавина (рис. 7.23 и 7.24). Родоначальником этого семейства является 7,8-диметил-10(1′-рибитил)изоаллоксазин. Все производные рибофлавина называют общим термином «флавины». В результате фосфорилирования рибитильной боковой цепи в 5'-позиции образуется флавин-

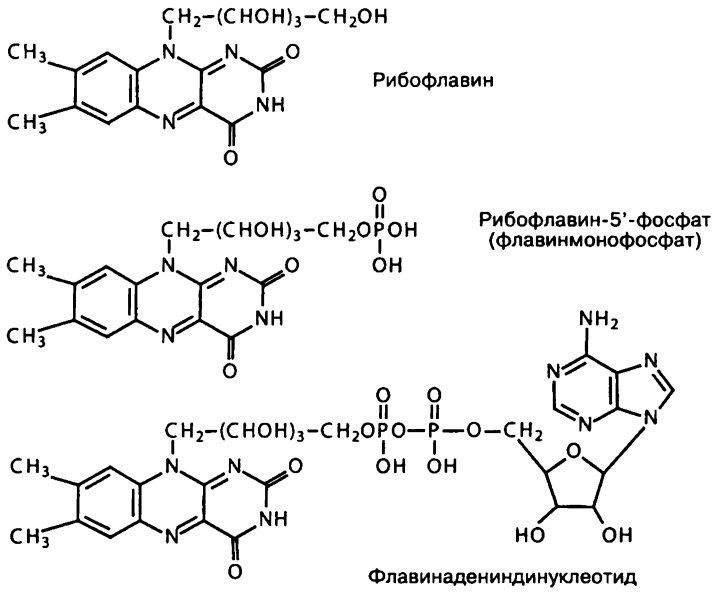


Рис. 7.23. Структурные формулы рибофлавина, флавинмононуклеотида и флавинадениндинуклеотида

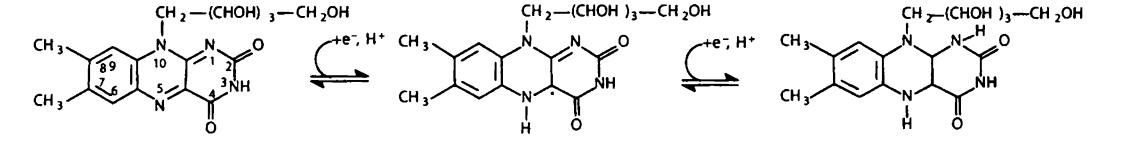


Рис. 7.24. Окислительно-восстановительное превращение флавинов

мононуклеотид (*FMN*). У флавинадениндинуклеотида (*FAD*) имеется дополнительный 5′-аденозил монофосфатный фрагмент (см. рис. 7.23) [30]. *FMN* и *FAD* являются коферментами многих флавин-зависимых ферментов, катализирующих различные окислительно-восстановительные процессы. Обе формы легко превращаются в рибофлавин под действием фосфатаз, присутствующих в пищевых продуктах и пищеварительном тракте. Относительно небольшая часть *FAD* (менее 10%) присутствует в биологических материалах в виде ковалентно связанного кофермента, в котором позиция 8α ковалентно присоединена к аминокислотному остатку ферментного белка.

Химические свойства рибофлавина и других флавинов весьма сложны. Каждая форма может существовать в виде нескольких соединений, различающихся степенью окисления и ионными формами [117]. Рибофлавин (как в свободной форме, так и в форме коферментов) имеет окислительно-восстановительный цикл, который включает три формы, различающихся степенью окисленности, — нативный (полностью окисленный) желтый флавохинон (см. рис. 7.24), флавосемихинон (красный или синий в зависимости от значения pH) и бесцветный флавогидрохинон. Каждое превращение в этой последовательности является одноэлектронным восстановлением и приемом H^+ У флавосемихинона N^5 значение pKa составляет около 8,4, а у флавогидрохинона N^1 — около 6,2.

В пищевых продуктах встречается также несколько минорных форм рибофлавина, но их происхождение и значение в питании человека изучены недостаточно. Более 80% от общего содержания флавинов в коровьем и грудном молоке составляют *FAD* и свободный рибофлавин (табл. 7.19) [120, 121]. Наиболее

Таблица 7.19
Содержание производных рибофлавина в свежих грудном (женском) и коровьем молоке. По [120, 121]

Соединение	Женское молоко, %	Коровье молоко, %
FAD	38–62	23–46 [a]
Рибофлавин	31–51	35–59
10-Гидроксиэтилфлавин	2–10	11–19
10-Формилметилфлавин	Следы	Следы
7α-Гидроксирибофлавин	Следы–0,4	0,1–0,7
8α-Гидроксирибофлавин	Следы	Следы–0,4

[a] После пастеризации содержание *FAD* снижается с 26 до 13% с увеличением на ту же величину процента рибофлавина.

интересной минорной формой является 10-гидроксиэтилфлавин — продукт метаболизма флавина бактериями, известный как ингибитор флавокиназы млекопитающих и способный ингибировать поступление рибофлавина в ткани. Другие минорные производные (например, люмифлавин) могут также действовать как антагонисты. Таким образом, в пищевых продуктах содержатся не только флавины с витаминной активностью (рибофлавин, *FAD* и *FMN*), но и соединения, затрудняющие транспорт и метаболизм рибофлавина. Все это свидетельствует, что для определения пищевой ценности продуктов необходим более глубокий анализ свойств различных форм рибофлавина и других витаминов.

7.8.3.2. Стабильность и процессы разложения

Наиболее стабилен рибофлавин в кислых средах, в нейтральных средах он менее стабилен, а в щелочных быстро разлагается. При обычной термообработке, транспортировке пищевых продуктов и кулинарной обработке рибофлавин достаточно хорошо сохраняется. Его потери при хранении дегидратированных пищевых систем (сухих зерновых завтраков и их моделей) пренебрежимо малы. Скорости разложения рибофлавина заметно увеличиваются при значениях активности воды, превышающих a_w для монослоя, и при повышенных температурах [30].

Разложение рибофлавина обычно является фотохимическим процессом, в результе которого образуются два биологически неактивных продукта — люмифлавин и люмихром (рис. 7.25), а также ряд свободных радикалов [155]. Облучение растворов рибофлавина видимым светом использовалось в течение многих лет для экспериментальной генерации свободных радикалов. Фотолиз рибофлавина приводит к образованию супероксида и радикалов рибофлавина (R•), реакция которых с кислородом дает пероксирадикалы и целый ряд других продуктов. Хотя степень влияния фотохимического разложения рибофлавина на процессы фоточувствительного окисления пищевых продуктов пока точно неизвестна, но она явно велика. Рибофлавин участвует в процессе фоточувствительного разложения аскорбиновой кислоты и, возможно, других лабильных витаминов. Причиной ухудшения вкуса молока при его хранении на солнечном свету и при искусственном (флуоресцентном) освещении также является рибофлавин-опосредованный фотохимический процесс. Несмотря на то что точный механизм этого процесса пока неизвестен, предполагается, что его стадиями являются фотохимические (по-видимому, радикальные) реакции декарбоксилирования и деаминирования метионина до метионаля ($CH_3–S–CH_2–CH_2–CH=O$). При этом происходит также мягкое окисление липидов молока. Улучшить качество молока можно путем отказа от стеклянных бутылок и совершенствования упаковочных материалов.

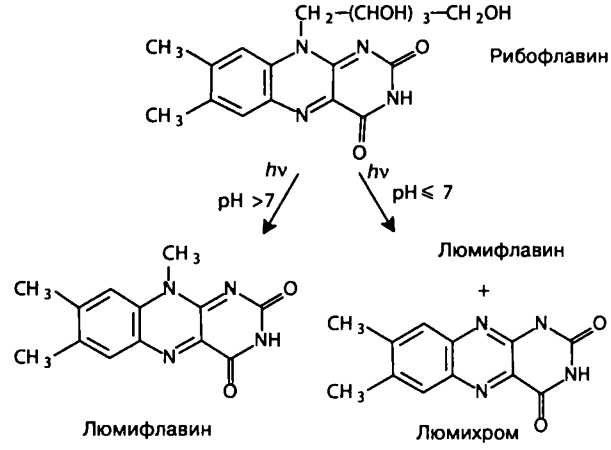


Рис. 7.25. Фотохимическое превращение рибофлавина в люмихром и люмифлавин

7.8.3.3. Биодоступность

Об усвояемости природных форм рибофлавина известно относительно немного, однако существуют немногочисленные данные о проблемах, связанных с его неполной усвояемостью. В экспериментах на крысах было показано, что минорные формы этого витамина — ковалентно связанные *FAD*-коферменты усваиваются очень слабо. Пищевая ценность производных рибофлавина, обладающих потенциальной антивитаминной активностью, для животных и человека пока не опередена.

7.8.3.4. Методы анализа

Способность полностью окисленных флавинов (флавохинонов, см. рис. 7.24) флуоресцировать широко используется для их аналитического определения. Традиционный метод определения общего содержания рибофлавина в пищевых продуктах включает измерение флуоресценции до и после его химического восстановления до нефлуоресцирующего флавогидрохинона [130]. Флуоресценция линейно зависит от концентрации разбавленного раствора, однако присутствие в нем некоторых компонентов пищи может мешать анализу. Для определения общего содержания рибофлавина в пищевых экстрактах можно также использовать ВЭЖХ [41, 147]. Применение методов ВЭЖХ и флуорометрии требует проведения экстракции разбавленной кислотой при нагревании и последующей обработки раствора фосфатазой в целях гидролиза *FMN* и *FAD до* рибофлавина. Методом ВЭЖХ можно также раздельно определять содержание индивидуальных форм рибофлавина в пищевых продуктах [120].

7.8.4. Ниацин

7.8.4.1. Строение и основные свойства

Ниацином называют пиридин-3-карбоновую кислоту (никотиновую) и ее производные со сходными витаминными свойствами. Наиболее стабильными формами витамина являются никотиновая кислота и ее амид (никотинамид, пиридин 3-карбоксамид). К коферментным формам ниацина относятся никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), каждый из которых может существовать в окисленной и восстановленной формах. Перенося восстановительные эквиваленты, коферменты НАД и НАДФ участвуют во многих дегидрогеназных реакциях. Нагревание (особенно кислых и щелочных растворов) переводит никотинамид в никотиновую кислоту без потери витаминной активности. В условиях, обычных для пищевых продуктов, на ниацин не действуют ни свет, ни повышенные температуры, и его потерь не наблюдается. Снижение содержания ниацина, как и других водорастворимых витаминов, возможно за счет их вымывания при мойке, бланшировании, кулинарной обработке и выделении тканевого сока. Ниацин широко распространен в овощах и продуктах животного происхождения. Дефицит этого витамина у американцев встречается редко, что частично объясняется успехом программы обогащения ниацином зерновых продуктов. Богатый белком рацион снижает потребность в ниацине благодаря образованию никотинамида из триптофана в ходе метаболизма.

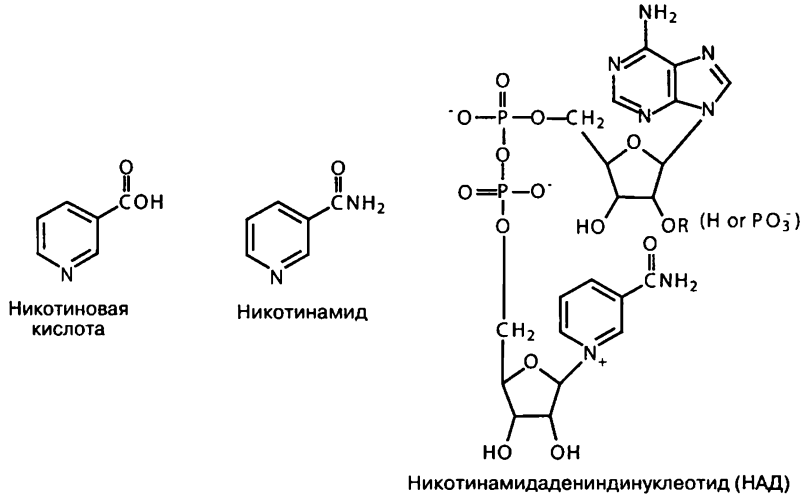


Рис. 7.26. Структурные формулы никотиновой кислоты, никотинамида и никотинамидадениндинуклеотида (фосфата). В НАД и НАДФ восстановление осуществляется за счет присоединения гидрида к C_4-атому пиридинового кольца

В некоторых зерновых продуктах ниацин присутствует в виде соединений, негидролизованные формы которых не обладают витаминной активностью. К таким соединениям относятся комплек-

сы углеводов, пептидов и фенолов, но их строение изучено еще недостаточно. Установлено, что таких химически связанных природных форм ниацина довольно много. В щелочных средах эти комплексы разрушаются с высвобождением ниацина, что дает возможность определить его общее содержание. В зернах злаковых культур присутствуют также этерифицированные формы никотиновой кислоты, обладающие в пищевых продуктах небольшой активностью ниацина.

В кофе в относительно больших количествах содержится природный алкалоид тригонеллин (N-метилникотиновая кислота), несколько меньше его в зернах злаков и бобах. В слабокислой среде, типичной для обжарки кофейных зерен, тригонеллин деметилируется с образованием никотиновой кислоты, причем концентрация ниацина в кофе повышается в 30 раз.

Соотношение различных форм ниацина при кулинарной обработке изменяется [150, 151] — так, при варке кукурузы из НАД и НАДФ выделяется свободный никотинамид. Кроме того, распределение форм ниацина зависит от сорта и степени зрелости (например, кукуруза молочной спелости против зрелого зерна).

7.8.4.2. Усвояемость

Малоценные в пищевом отношении формы ниацина в пищевых продуктах растительного происхождения известны довольно давно, хотя их химическая природа изучена недостаточно. Кроме уже упоминавшихся химически связанных форм в продуктах растительного происхождения встречаются и другие плохо усваиваемые формы ниацина [150], к которым относятся НАДН (восстановленная форма НАД) и, возможно, НАДФН. Их очень плохая усвояемость объясняется нестабильностью этих соединений в кислой среде желудка. Следует, однако, отметить, что содержание восстановленных форм в пищевых продуктах низко. Главным фактором, влияющим на усвояемость, является соотношение содержания свободного и химически связанного ниацина. Содержание ниацина в щелочном экстракте зачастую намного превышает содержание биологически усвояемого (в экспериментах на крысах) или свободного ниацина (табл. 7.20) [150].

Таблица 7.20

Содержание ниацина в некоторых пищевых продуктах, определенное химическими методами (кислотная или щелочная экстракция) и в экспериментах на крысах. Экстракция соляной кислотой позволяет определить содержание «свободного» ниацина, щелочная экстракция — общее содержание ниацина, а эксперименты на крысах — содержание биологически доступного ниацина. По [150]

Пищевой продукт	Ниацин		
	Свободный ниацин, мкг/г сырой массы	Общий ниацин (щелочной экстракт), мкг/г сырой массы	Биологически усвояемый ниацин, мкг/г сырой массы
Кукуруза	0,4	25,7	0,4
Вареная кукуруза	3,8	23,8	6,8
Кукуруза после щелочной варки (без удаления жидкости)	24,6	24,6	22,3
Тортильи (кукурузные лепешки)	11,7	12,6	14
Сладкая кукуруза (сырая)		54,5	40
Пропаренная сладкая кукуруза	45	56,4	48
Вареное сорго	1,1	45,5	16
Вареный рис	17	70,7	29
Вареная пшеница		57,3	18
Жареный картофель	12	51	32
Жареная печень	297	306	321
Жареная фасоль	19	24	28

7.8.4.3. Методы анализа

Содержание ниацина может быть определено микробиологическими методами. Химический метод основан на реакции ниацина с цианбромидом (бромистым цианом), в результате которой образуется

N-замещенный пиридин, который затем вследствие его реакции с ароматическим амином образует окрашенное соединение [37]. Никотиновую кислоту и никотинамид в пищевых продуктах можно определить с помощью ВЭЖХ [41,147], позволяющей определить содержание свободного и связанных форм ниацина в зернах злаков [150, 151].

7.8.5. Витамин B_6

7.8.5.1. Структура и основные свойства

Термином «витамин B_6» обозначают 2-метил-, 3-гидрокси- и 5-гидроксиметилпиридины, обладающие витаминной активностью пиридоксина (*PN*). Различные формы этого витамина отличаются одноуглеродными заместителями в 4-й позиции (рис. 7.27). В пиридоксине заместителем является спиртовая группа $-CH_2OH$, в пиридоксале (*PL*) — альдегидная, $-C(=O)H$), а в пиридоксамине (*PM*) — аминная, $-CH_2NH_2$. Эти три основные соединения могут быть также в фосфорилированной форме (по 5-гидроксиметильной группе), то есть в виде пиридоксин-5′-фосфата (*PNP*), пиридоксаль-5′-фосфата (*PLP*) или пиридоксамин-5′-фосфата (*PMP*). Витамин B_6 в форме *PLP* и в меньшей степени *PMP* участвует как кофермент более чем в 100 ферментативных реакциях метаболизма аминокислот, углеводов, липидов и нейротрансмиттеров. Все указанные выше формы витамина B_6 обладают витаминной активностью, поскольку они могут превращаться в эти коферменты *in vivo*. Термин «пиридоксин» как общее название витамина B_6 употреблять не рекомендуется, как и термин «пиридоксол» вместо «пиридоксин».

Гликозилированные формы витамина B_6 присутствуют во многих фруктах, овощах, злаках, причем в основном в виде пиридоксин-5′-β-*D*-глюкозида (см. рис. 7.27) [56, 157]. Их доля составляет от 5 до 75% общего содержания витамина B_6. 15–20% этого витамина в типичном смешанном рационе представлены гликолизированными формами. Пищевая ценность пиридоксин-глюкозида проявляется только после его гидролиза в кишечнике или в других органах под действием β-глюкозидазы. В некоторых продуктах растительного происхождения выявлены и другие гликозилированные формы витамина B_6.

В процессах ионизации участвует несколько групп, входящих в состав соединений витамина B_6 (табл. 7.21) [134]. Благодаря основному характеру пиридиниевого азота (pK_a ~ 8) и кислотному характеру группы 3-OH (pK_a ~ 3,5–5,0) пиридиновое кольцо молекулы витамина B_6 в нейтральной среде находится в основном в цвиттер-ионной форме. Заряд соединений группы витамина B_6 зависит от значения pH раствора. На суммарный заряд также влияют 4′-аминогруппа *PM* и *PMP* (pK_a ~ 10,5) и 5′-фосфоэфирная группа *PLP* и *PMP* (pK_a < 2,5, ~6 и ~12).

В пищевых продуктах присутствуют все формы витамина B_6, хотя и в разных количествах. *PN*-глюкозид встречается только в продуктах растительного происхождения, причем в большинстве из них содержатся и все другие формы этого витамина. В мясе витамин B_6 находится преимущественно (более 80%) в виде *PLP* и *PMP* и в небольших количествах — в форме нефосфорилированных соединений. Разрушение растительных тканей в циклах замораживания-оттаивания или при гомогенизации приводит к выделению фосфатаз и β-глюкозидаз, которые, катализируя реакции дефосфорилирования и дегликозилирования, могут изменить соотношение форм витамина B_6. Аналогичным образом разрушение животных тканей перед кулинарной обработкой может вызвать интенсивное дефосфорилирование *PLP* и *PMP*. *PNP* является интермедиатом метаболизма витамина B_6 и обычно присутствует в пище в очень малых количествах. Благодаря своей высокой стабильности, *PN* в виде гидрохлорида используется для обогащения пищевых продуктов и в составе БАД. Вследствие потенциальной нейротоксичности не следует потреблять витамин B_6 в составе БАД в количествах, превы-

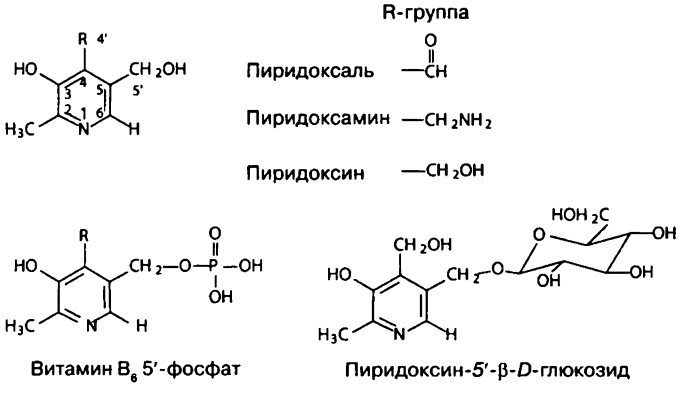


Рис. 7.27. Структурные формулы соединений витамина B_6

Таблица 7.21
Значения pK_a соединений витамина B_6. По [134]

Ионизирующийся фрагмент	Значения pK_a				
	PN	*PL*	*PM*	*PLP*	*PMP*
3-OH	5,00	4,20–4,23	3,31–3,54	4,14	3,25–3,69
Пиридиниевый N	8,96–8,97	8,66–8,70	7,90–8,21	8,69	8,61
4'-аминогруппа			10,4–10,63		Нет данных
5'-фосфоэфирная группа					
pK_{a1}				< 2,5	< 2,5
pK_{a2}				6,20	5,76

шающих 100 мг/сут. БАД, содержащие другие формы витамина B_6, в частности, пиридоксаль фосфат, не увеличивают пищевую ценность по сравнению с *PN*. Помимо гидрохлорида, *PN* продается также в форме комплекса пиридоксин-α-кетоглутарат (*PAK*). Заявления о пользе *PAK* недостаточно научно обоснованы, и его потребление более 100 мг/сут (в *PN*-эквиваленте) может быть связано с риском для здоровья.

Альдегидные и аминные формы витамина B_6 легко вступают в карбонил-аминные реакции: *PLP* и *PL* — с аминами, *PMP* и *PM* — с альдегидами или кетонами (рис. 7.28). Коферментная функция *PLP* в витамин B_6-зависимых ферментах включает карбонильно-аминную конденсацию. *PLP* и *PL* легко образуют основания Шиффа с нейтральными аминогруппами аминокислот, пептидов и белков. Координированная ковалентная связь с ионом металла увеличивает стабильность оснований Шиффа в неферментных системах, но эти основания могут существовать в растворах и в отсутствие ионов металла. *PLP* образует основания Шиффа намного легче, чем *PL*, поскольку фосфатная группа *PLP* препятствует возникновению внутреннего полуацеталя и поддерживает таким образом карбонильную группу в реакционноспособном состоянии (рис. 7.29) [154]. Как и другие взаимодействия карбонилов с аминами, неферментативное образование витамином B_6 оснований Шиффа сильно зависит от значения pH, причем оно максимально в щелочных средах. Стабильность оснований Шиффа также существенно зависит от pH (в кислых средах они диссоциируют). Таким образом, можно ожидать, что в желудке основания Шиффа, образованные из витамина B_6, будут распадаться. Помимо оснований Шиффа, показанных на рис. 7.28, в равновесии с ними могут находиться и другие таутомерные и ионные формы.

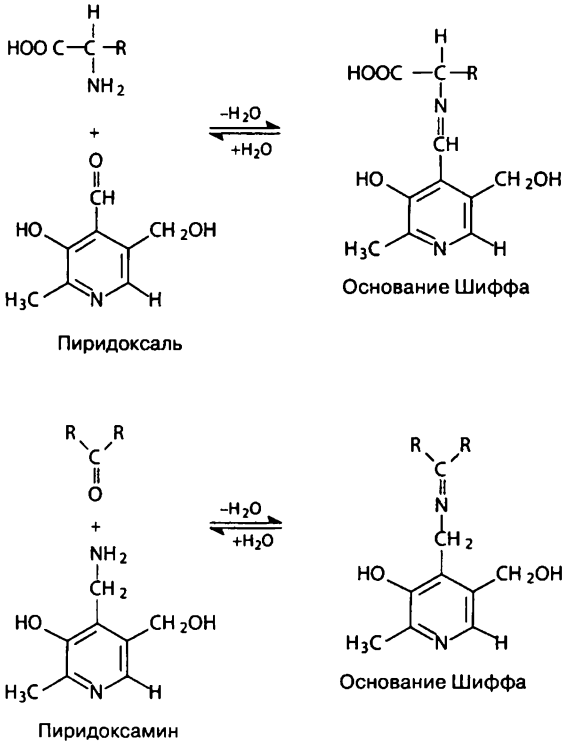


Рис. 7.28. Образование оснований Шиффа из пиридоксаля и пиридоксамина. Аналогичные реакции характерны для *PLP* и *PMP*

В некоторых случаях основания Шиффа могут образовывать циклические структуры — например, цистеин конденсируется с *PLP* или *PL* с образованием основания Шиффа, затем SH-группа взаимодействует с 4'-углеродным атомом, образуя циклическое производное тиазолидина (рис. 7.30). Гистидин, триптофан

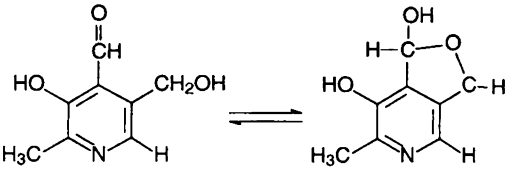


Рис. 7.29. Образование пиридоксальполуацеталя

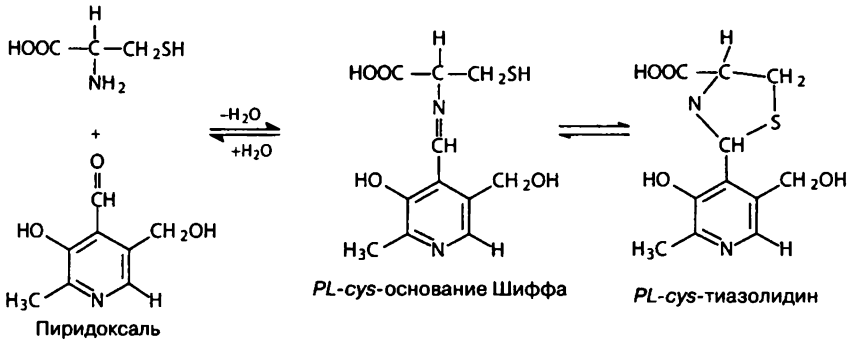


Рис. 7.30. Образование из пиридоксаля и цистеина оснований Шиффа и тиазолидиновых комплексов

и некоторые другие соединения (например, гистамин и триптамин) также образуют с *PL* и *PLP* сходные циклические комплексы, в формировании которых задействованы соответственно имидазольные и индольные боковые цепи. Считается, что эти циклические производные усваиваются полностью, поскольку кислая среда желудка способствует диссоциации *PL* или *PLP* от аминокислот.

7.8.5.2. Стабильность и процессы разложения

Режимы термообработки и условия хранения пищевых продуктов могут влиять на витамин B_6 по-разному. Как и другие водорастворимые витамины, он может вымываться водой. К химическому изменению могут привести также взаимопревращения форм витамина, его термическое или фотохимическое разложение, а также образование необратимых комплексов с белками, пептидами или аминокислотами.

Взаимопревращения форм витамина B_6 происходят главным образом в результате неферментативного трансаминирования с образованием оснований Шиффа, миграции их двойной связи, а также последующих гидролиза и диссоциации. Неферментативное трансаминирование как модель *PLP*-опосредованного ферментативного трансаминирования изучено достаточно полно. Этот процесс весьма интенсивно протекает при тепловой обработке пищевых продуктов, содержащих альдегидные и аминные формы витамина B_6. Так, при кулинарной тепловой обработке мяса и молочных продуктов зачастую повышается содержание *PM* и *PMP* [11,57], причем аналогичные изменения характерны и для жидких модельных систем на основе белка [55]. Эти реакции трансаминирования не приводят к потере пищевой ценности. Аналогичные процессы трансаминирования протекают и при хранении модельных пищевых систем со средним содержанием влаги (a_w около 0,6). При обработке пищевых продуктов может происходить также *PL*-опосредованное неферментативное выделение из серосодержащих аминокислот H_2S и метилмеркаптана с появлением специфического запаха и изменением цвета консервированных продуктов вследствие образования *FeS* черного цвета [58].

Все формы витамина B_6 светочувствительны, и их фотохимическое разложение может привести к потерям витамина при переработке пищевых продуктов, их хранении и анализе. Механизм фотохимического разложения витамина B_6 в деталях неизвестен, как и зависимость скорости разложения от длины волны света. По-видимому, при облучении происходит фотохимическое окисление с образованием свободных радикалов как промежуточных продуктов. Воздействие света приводит к образованию из *PL* и *PM* производных 4-пиридоксиловой кислоты, не обладающих витаминной активностью, а из *PLP* и *PMP* — 5'-фосфата 4-пиридоксиловой кислоты, что свидетельствует о фотохимическом окислении [116, 124]. Вместе с тем скорость и глубина фотохимического разложения *PLP, PMP и PM* в отсутствии и в присутствии воздуха различаются очень мало, то есть инициирование окисления не требует прямого участия кислорода. Фотохимическое разложение *PL* в модельных пищевых системах с низким содержанием влаги протекает быстрее, чем *PM и PN*. По концентрации *PL* реакция имеет первый порядок, причем ее скорость сильно зависит от температуры, и меньше — от активности воды (табл. 7.22) [124].

Скорость нефотохимического разложения витамина B_6 существенно зависит от его формы, температуры, pH раствора и присутствия других реакционноспособных соединений (белков, аминокислот и редуцирующих сахаров). Все формы витамина B_6 очень стабильны в сильнокислой среде (0,1 М HCl), то есть в условиях, при которых обычно проводят его экстракцию в ходе анализа. Инкубация витамина B_6 в водных буферных растворах (pH 4–7) при температуре 40 или 60 °C в течение 140 сут не приводит к каким-либо потерям *PN*. *PM* наиболее нестабилен при pH 7, а *PL* — при pH 5 (табл. 7.23) [124]. При указанных температурах процесс разложения *PL* и *PM* описывается уравнением первого порядка. При более высоких

Таблица 7.22.

Влияние температуры, значения a_w и освещенности на разложение пиридоксаля в дегидратированной модельной пищевой системе. По [124]

Освещенность, люмен/м²	Значение a_w	Температура, °С	Константа скорости реакции первого порядка k, сут.$^{-1}$	Период полураспада $t^1/^2$, сут
4300	0,32	5	0,092	7,4
		28	0,1085	6,4
		37	0,2144	3,2
		55	0,3284	2,1
	0,44	5	0,0880	7,9
		28	0,1044	6,6
		55	0,3453	2,0
2150	0,32	27	0,0675	10,3

Таблица 7.23

Влияние значения pH и температуры на разложение пиридоксаля и пиридоксамина в водном растворе. При pH 4–7 и температуре 40 или 60 °С разложения пиридоксина не наблюдается в течение 140 сут. По [124]

Соединение	Температура, °С	Значение pH	Константа скорости реакции первого порядка k, сут$^{-1}$	Период полураспада $t^1/^2$, сут
Пиридоксаль	40	4	0,0002	3466
		5	0,0017	407
		6	0,0011	630
		7	0,0009	770
	60	4	0,0011	630
		5	0,0225	31
		6	0,0047	147
		7	0,0044	157
Пиридоксамин	40	4	0,0017	467
		5	0,0024	289
		6	0,0063	110
		7	0,0042	165
	60	4	0,0021	330
		5	0,0044	157
		6	0,0110	63
		7	0,0108	64

температурах (110–145 °С) разложение *PL, PN и PM* в водном растворе при pH 7,2 подчиняется соответственно уравнениям второго, полуторного и псевдопервого порядка [106]. В ходе параллельных исследований было установлено, что термическое разложение витамина B_6 в пюре из цветной капусты также не подчиняется уравнению первого порядка, но причина этих различий в кинетике не ясна — так, в условиях сухого нагрева, имитирующего процесс обжарки, разложение *PN* в дегидратированных модельных системах подчиняется уравнению первого порядка [39].

Изучение термостабильности витамина B_6 в пищевых продуктах осложняется наличием нескольких форм этого витамина, разлагающихся по-разному и к тому же превращающихся друг в друга. Общие потери витамина B_6 при термообработке и хранении сопоставимы с потерями других водорастворимых витаминов. Так, бобы гарбанзо (нут, турецкий горох) и лимская фасоль при бланшировании и консервировании теряют примерно 20–25% витамина B_6.

Развитие ВЭЖХ-методов дало толчок изучению химических превращений витамина B_6 в ходе переработки и хранения. Изучение изменений, происходящих при термообработке и хранении модельных пищевых систем со средним содержанием влаги и жидких систем, имитирующих продукты детского питания,

показало, что в ходе этих процессов происходят взаимопревращения *PL* и *PM*, а также снижение общего содержания витамина B_6, описывающееся уравнением первого порядка (табл. 7.24 и рис. 7.31) [55]. Было показано, что *PN* более стабилен, чем *PL* или *PM*, однако степень различий зависит от температуры (см. табл. 7.23). Хотя различия в энергии активации свидетельствуют о разном механизме разложения этих трех форм витамина B_6, термодинамические расчеты свидетельствуют, что во всех случаях наблюдается одна и та же скоростьлимитирующая стадия разложения [50]. Для более полного понимания процессов с участием природных форм витамина B_6 в различных пищевых продуктах необходимо продолжать работы по изучению его стабильности.

Систематические исследования термостабильности витамина B_6 в молочных продуктах были инициированы серьезным инцидентом с продуктами детского питания. В начале 1950-х гг. у детей, которым давали промышленно произведенные продукты детского питания на молочной основе, было отмечено более 50 случаев судорожных припадков [23], тогда как у тысяч других детей, употреблявших тот же продукт, этого не наблюдалось. Эти припадки были сняты путем назначения детям дополнительного приема *PN*. Впоследствии недостаточное содержание витамина B_6 было скорректировано за счет обогащения детского питания пиридоксином – намного более стабильной формой витамина B_6, чем *PL* — основная форма этого витамина в молоке [64]. Установлено, что при стерилизации сгущенного молока или необогащенного детского питания

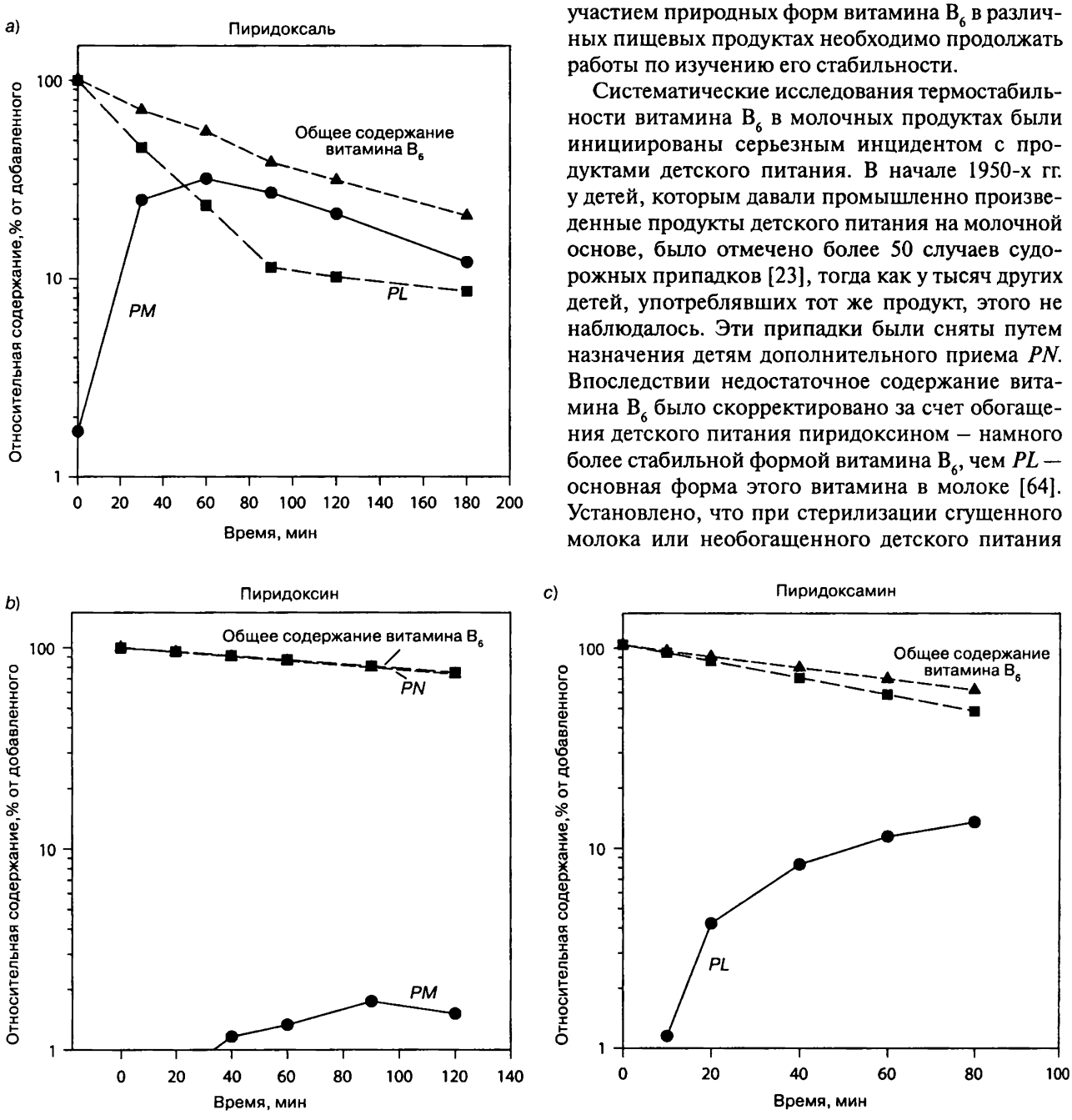


Рис. 7.31. Разложение и взаимопревращение форм витамина B_6 в ходе термообработки при 118 °С жидкой пищевой системы, моделирующей продукты детского питания. Начальное содержание витамина B_6: *a* — 100% *PL*; *b* — 100% *PN*; *c* — 100% *PM*. По [55]

Таблица 7.24

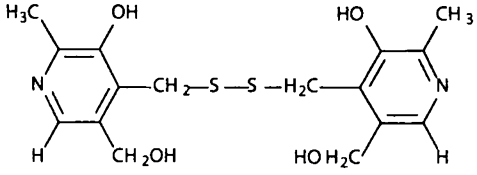
Константы скорости реакции и энергия активации процессов терморазложения витамина B_6 в жидких системах, моделирующих продукты детского питания. По [55]

Форма вносимого витамина B_6	Температура, °С	Константа скорости реакции первого порядка k, $сут^{-1}$	Период полураспада $t^1/^2$, мин	Энергия активации, кДж/моль
Пиридоксин	105	0,0006	1120	114
	118	0,0025	289	
	133	0,0083	62	
Пиридоксамин	105	0,0021	340	99,2
	118	0,0064	113	
	133	0,0187	35	
Пиридоксаль	105	0,0040	179	87,0
	118	0,0092	75	
	133	0,0266	24	

теряется 40–60% природного витамина B_6, тогда как пиридоксин при аналогичной термообработке практически не разлагается. Все это показывает, насколько важно правильно оценивать пищевые свойства продукта, особенно при внедрении новых рецептур и технологических операций.

Дефицит витамина B_6 при потреблении необогащенного детского питания был обусловлен (по крайней мере, частично) взаимодействием *PL* с молочным белком и образованием серосодержащего соединения — *бис*-4-пиридоксилдисульфида (рис. 7.32) [55]. Это соединение медленно образуется при нагревании концентрированного раствора *PL* в присутствии цистеина [153]. В экспериментах на крысах было показано, что *бис*-4-пиридоксилдисульфид обладает лишь 20%-ной активностью витамина B_6. Участие сульфгидрильных групп во взаимодействии *PL* с молочным белком было выявлено в работе [135], однако эксперименты с использованием ВЭЖХ и меченых *PL* и *PLP* не подтвердили образования *бис*-4-пиридоксилдисульфида при термообработке молока [57]. Формы *PL* и *PLP* присоединяются к ε-аминогруппам лизиновых остатков молочных белков посредством восстановления –C=N– мостика основания Шиффа (рис. 7.33). Пиридоксиллизиновые фрагменты образуются также при термообработке мышечных тканей и печени, а также при хранении модельных пищевых систем со средним содержанием влаги. Механизм восстановления этого –C=N– мостика основания Шиффа пока неясен.

Было показано, что связанные с белками пищи пиридоксиллизиновые фрагменты обладают по сравнению с *PN* примерно 50%-ной витаминной активностью [47]. При введении пиридоксиллизиновых производных крысам с дефицитом витамина B_6 недостаток этого витамина еще



Бис-4-пиридоксилдисульфид

Рис. 7.32. Структурная формула *бис*-4-пиридоксилдисульфида

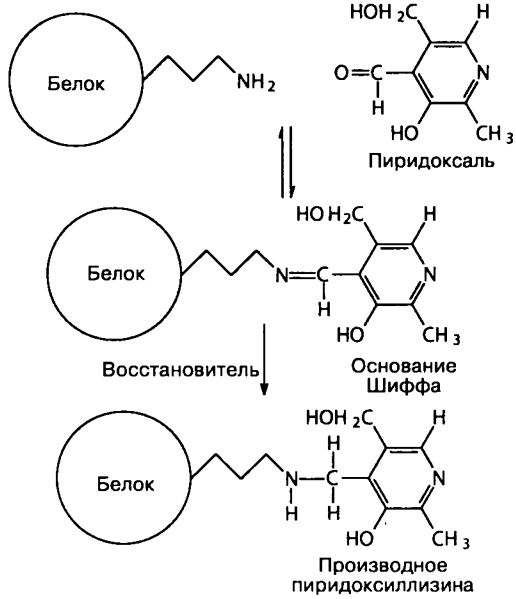


Рис. 7.33. Взаимодействие *PL* и ε-аминогруппы лизинового остатка пищевого белка с образованием основания Шиффа и последующим восстановлением пиридоксиламинового комплекса

больше увеличивается. Этот эффект вполне может быть причиной возникновения витаминного дефицита при потреблении необогащенных термообработанных продуктов детского питания.

Роль сульфгидрильных групп белка во взаимодействии *PL* с белками пока не совсем ясна. Эти группы, как и ε-амино- или имидазольные группы боковых цепей аминокислот, могут обратимо воздействовать на связь основания Шиффа *PL*, связанным с белком, с образованием замещенного альдамина по схеме, аналогичной приведенной на рис. 7.30.

При взаимодействии со свободными радикалами витамин B_6 может превратиться в биологически неактивные соединения. Гидроксильные радикалы, возникающие при разложении аскорбиновой кислоты, могут атаковать С6-позицию *PN* с образованием 6-гидроксипроизводного, полностью лишенного активности витамина B_6 [138]. По-видимому, так же реагируют ОН-радикалы и с другими формами витамина B_6.

7.8.5.3. Усвояемость витамина B_6

На усвояемость витамина B_6 влияет много факторов [53], но при типичном смешанном рационе взрослого человека она составляет около 75% [141]. Пищевые *PL, PN, PM, PLP, PMP и PNP* весьма эффективно всасываются и участвуют в метаболизме витамина B_6. Основания Шиффа из *PL, PLP, PM и PMP* в кислой среде желудка диссоциируют и хорошо усваиваются.

В организме человека частично утилизируются *PN*-глюкозид и другие гликозилированные формы витамина B_6. В среднем усвояемость *PN*-глюкозида составляет 50–60% от усвояемости *PN*, хотя у разных людей эти цифры могут широко варьировать. Значение неполной биодоступности *PN*-глюкозида из рациона человека зависит, главным образом, от общего количества потребленного витамина B_6 и конкретных пищевых продуктов. Эффективными источниками витамина B_6 могут быть даже продукты с высоким содержанием *PN*-глюкозида. Усвояемость *PN*-глюкозида для животных во многом обусловлена их видовыми различиями. При анализе витамина B_6 необходимо использовать такие методы, которые позволяют определять гликозилированные формы и, в идеале, специфически измерять количество каждого соединения.

Определение усвояемости *PL* или *PLP* в форме производных пиридоксиламина, например, пиридоксиллизина (см. рис. 7.33) — задача весьма непростая. В отличие от оснований Шиффа у этих производных очень стабильный восстановленный мостик между *PL* или *PLP* и ε-аминогруппой лизина. Вследствие наличия этой стабильной ковалентной связи в обычно используемых при анализе витамина B_6 условиях проведения экстракции этот комплекс диссоциирует мало либо не диссоциирует вовсе. Следовательно, образование этой стабильной ковалентной связи между *PL* или *PLP* и белком, по-видимому, выглядит как разложение витамина B_6 и приводит к уменьшению количества измеряемого витамина B_6. С точки зрения биоусвояемости, как мы уже отмечали, биодоступность *PLP*-пиридоксиллизина составляет около 50% [47], то есть ферменты млекопитающих способны частично расщеплять связь «пиридоксил–лизил» с образованием свободного *PLP*.

7.8.5.4. Определение содержания витамина B_6

Содержание витамина B_6 определяют микробиологическими тестами или ВЭЖХ-методами [51]. Микробиологическую оценку общего витамина B_6 проводят по росту дрожжей *Saccharomyces uvarum* или *Kloeckera brevis* после проведения кислотного гидролиза пищевого продукта с целью разрушения фосфатных эфиров и β-глюкозидов и последующей экстракции витамина B_6. К результатам микробиологических анализов следует подходить осторожно, так как они могут давать заниженное содержание *PM*. ВЭЖХ-методы основаны главным образом на обращенно-фазном или ионообменном разделении с флуорометрическим детектированием, причем можно определять содержание каждой формы витамина B_6.

7.8.6. Фолат

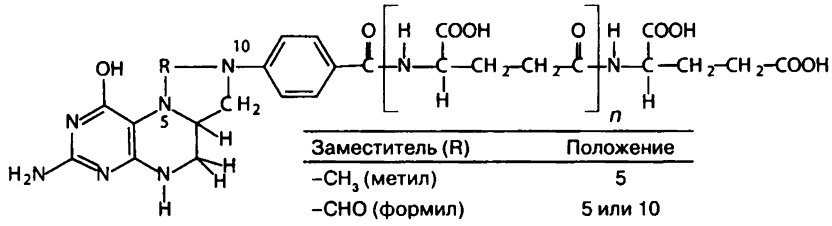
7.8.6.1. Структура и основные свойства

Термином «фолат» обозначают класс производных птеридина, имеющих сходные с фолиевой (птероил-*L*-глутаминовой) кислотой строение и пищевые (витаминные) свойства. Использовать устаревшие термины «фолацин» и «фолиевая кислота» для этой группы соединений не рекомендуется. В состав фо-



Фолиевая (птероил-*L*-глутаминовая) кислота

Тетрагидрофолаты



Заместитель (R)	Положение
$-CH_3$ (метил)	5
–CHO (формил)	5 или 10
–CH=NH (формимино)	5
$-CH_2-$ (метилен)	5 и 10
–CH= (метенил)	5 и 10

Рис. 7.34. Структурные формулы фолатов

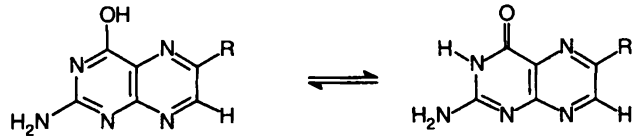


Рис. 7.35. Резонанс 3,4-амидного фрагмента птеридиновой части молекулы фолата. Показана полностью окисленная форма птеридина. 5,6,7,8-тетрагидрофолаты (H_4-фолаты) и 7,8-дигидрофолаты (H_2-фолаты) ведут себя одинаково

лиевой кислоты входит остаток *L*-глутаминовой кислоты, соединенный с пара-аминобензойной кислотой, которая присоединена к 2-амино-4-гидроксиптеридину (рис. 7.34). Птеридиновый фрагмент в фолиевой кислоте присутствует в окисленной форме. Все фолаты имеют амидоподобную структуру, две резонансные формы которой представлены на рис. 7.35.

Фолиевая кислота (птероил-*L*-глутаминовая) в природе встречается только в следовых количествах. Основными ее формами в растениях, животных и микроорганизмах являются полиглутаматы 5,6,7,8-тетрагидрофолатов (H_4-фолаты) (см. рис. 7.34), в которых две двойные связи птеридинового кольца окислены. В природе существуют в небольших количествах также 7,8-дигидрофолаты (H_2-фолаты). H_4-фолаты являются медиаторами транспорта и превращений (восстановления и окисления) одноуглеродных соединений, что объясняет наличие в живых клетках фолатов, имеющих различные одноуглеродные заместители в положениях N^5 или N^{10} (преимущественно метильные или формильные) или метиленовые ($-CH_2-$) или метениловые (–CH=) мостики между N^5 и N^{10}. Многие природные формы фолатов в растительных и животных тканях и в продуктах растительного и животного происхождения имеют боковую цепь из 5–7 глутаматных остатков с γ-пептидными мостиками. Считается, что около 50–80% природных фолатов, обладающих витаминной ценностью, существуют в полиглутамильной форме. С 1998 г. в США большинство зерновых продуктов (мука, хлебобулочные и макаранные изделия, рис и т. д) в соответствии с федеральными нормативными актами обогащают синтетической фолиевой кислотой, что обеспечивает поступление в организм с обычным рационом 25–50% от общего количества фолатов в форме синтетической фолиевой кислоты. Следует отметить, однако, что данных о содержании различных форм фолатов в конкретных пищевых продуктах или в рационе в целом недостаточно. Все фолаты независимо от степени окисления птеридина, вида одноуглеродных заместителей в положениях N^5 или N^{10} и длины полиглутамильной цепи обладают витаминной активностью. Многие структурные аналоги фолатов (в частности, с 4-аминогруппой) являются их мощными антагонистами и используются в химиотерапии онкологических и аутоиммунных заболеваний.

В зависимости от значения pH фолаты существуют в различных ионных формах (табл. 7.25) [112]. Влияние pH на стабильность, спектры поглощения и процессы хроматографического разделения фолатов частично объясняется изменениями заряда птеридиновой системы.

Наличие асимметрических атомов углерода (глутамильного α-углерода у всех фолатов и птеридинового атома C^6 у H_4-фолатов) объясняет существование двух разных конфигураций (изомеров). Чтобы соединение обладало витаминной активностью, глутамильный фрагмент должен быть в *L*-форме; активной

Таблица 7.25
Значения pK_a ионизируемых групп фолатов. По [112]

Фолат	Амида	N^1	N^5	N^{10}	α-COOH	γ-COOH
5,6,7,8-H_4-фолат	10,5	1,24	4,82	−1,25	3,5	4,8
7,8-H_2-фолат	9,54	1,38	3,84	0,28	ND[a]	ND[a]
Фолиевая кислота	8,38	2,35	<−1,5	0,20	ND[a]	ND[a]

[a] Относится к диссоциации N^3–C^4-фрагмента.
[b] ND — не определено из-за недостаточной растворимости. Предполагается, что значения pK_a этих карбоксильных групп для всех фолатов одинаковы.

формой тетрагидрофолата является S-изомер. Тетрагидрофолаты, полученные химическим восстановлением фолиевой кислоты, представляют собой рацемическую смесь C^6 изомеров, тогда как ферментативно восстановленные являются S-изомерами. Поскольку свойствами витамина в организмах животных и человека обладает только 6S-изомер, рацемическая (6R + 6S) смесь H_4-фолатов при микробиологическом определении обладает только 50% витаминной активностью.

5-формил- или 10-формилфолаты содержат в качестве одноуглеродного заместителя альдегидную группу. Формилфолаты могут переходить друг в друга, причем интермедиатом этого процесса является 5,10-метениловое производное, образованию которого способствует кислая среда (pH < 2). Это соединение в минорных количествах входит в состав большинства пищевых продуктов. Промежуточное образование 5,10-метенил-H_4-фолата при pH > 2 объясняет превращение 10-формил-H_4-фолата в более стабильный 5-формил-H_4-фолат при нагревании в слабых кислотах и образование 10-формил-H_4-фолата из 5-формил-H_4-фолата [119].

Стабильность H_4-фолатов существенно зависит от типа одноэлектронного заместителя и его устойчивости к окислительной деградации. В большинстве случаев стабильность фолиевой кислоты с полностью окисленным циклическим птеридиновым кольцом намного выше, чем H_4 или H_2-фолатов. Стабильность H_4-фолатов уменьшается в следующей последовательности:

5-формил-H_4-фолат > 5-метил-H_4-фолат > 10-формил-H_4-фолат > H_4-фолат.

Стабильность каждого фолата зависит только от химической природы птеридинового цикла, а длина боковой полиглутамильной цепи не оказывает на нее никакого влияния. Влияние различных факторов на стабильность фолатов рассматривается в следующем разделе.

Все фолаты склонны к окислительному разложению, но механизм и состав продуктов разложения зависят от химической природы фолата. Восстановители (в частности аскорбиновая кислота и тиолы) благодаря их действию как ловушек кислорода и свободных радикалов, а также редуцирующим свойствам ингибируют окислительное разложение фолатов.

Помимо молекулярного кислорода во взаимодействие с фолатами вступают и другие окислители, присутствующие в пище. Например, гипохлорит в концентрациях, обычно используемых при антимикробной обработке, вызывает окислительный распад фолиевой кислоты, H_2-фолатов и H_4-фолатов до соединений, не обладающих витаминной активностью. В тех же условиях другие фолаты (в частности, 5-метил-H_4-фолат) превращаются в формы, частично сохраняющие витаминную активность. Распад фолатов происходит и на свету, однако механизм их фотохимического разложения пока неясен.

До начала обогащения пищевых продуктов в США фолиевой кислотой фолат являлся одним из самых дефицитных витаминов в рационе (эта ситуация характерна в настоящее время для стран, где не применяется обогащение фолиевой кислотой). Дефицит фолата в питании человека в основном может быть обусловлен следующими причинами:

- неправильным рационом, то есть недостаточным потреблением пищи, богатой фолатом (фруктов, особенно цитрусовых, зеленых овощей и мясных субпродуктов);

  потерями фолата при переработке и кулинарной обработке вследствие окисления и/или вымывания;
- неполной усвояемостью многих природных форм фолата [54].

Благодаря своей высокой стабильности фолиевая кислота является единственной формой фолата, добавляемой к пищевым продуктам и входящей в состав поливитаминных комплексов. В клинических ситуациях, требующих применения восстановленного фолата, используют 5-формил-H_4-фолат, стабильность которого сравнима со стабильностью фолиевой кислоты. Фолат в форме 5-метил-H_4-фолата иногда входит в состав некоторых БАД к пище.

7.8.6.2. Стабильность и процессы разложения

7.8.6.2.1. Стабильность фолата

При производстве и хранении обогащенных продуктов и премиксов фолиевая кислота прекрасно сохраняется. При длительном хранении продуктов с низким содержанием влаги наблюдается лишь незначительное разложение этого витамина (см. табл. 7.2 и 7.3) [48]. Сходная хорошая сохранность фолиевой кислоты наблюдается также при хранении обогащенных продуктов детского питания и лекарственных препаратов.

Во многих работах отмечается, что существует определенный риск больших потерь фолата при технологической переработке и кулинарной обработке пищевых продуктов. Помимо окислительного разложения это может быть связано с переходом фолата в отвар (табл. 7.26) [88]. Общие большие потери фолата зависят от степени вымывания, форм фолата, природы химического окружения (катализаторы, окислители, буферные ионы) и значения pH. Таким образом, предсказать, насколько сохранится фолат в том или ином продукте, довольно трудно.

Таблица 7.26

Влияние тепловой обработки (варки) на содержание фолата в некоторых овощах.По [88]

Овощи (варка в воде в течение 10 мин)	Общее содержание фолата[a], мкг/100 г сырой массы		
	Сырой продукт	Готовый продукт	Содержание фолата в отваре
Спаржа	175 ± 25	146 ± 16	39 ±10
Капуста-брокколи	169 ± 24	65 ±7	116 ±35
Брюссельская капуста	88 ±15	16 ±4	17 ±4
Кочанная капуста	30 ±12	16 ±8	17 ±4
Цветная капуста	56 ±18	42 ±7	47 ±20
Шпинат	143 ± 50	31 ±10	92 ±12

[a] Среднее значение ± стандартное отклонение, $n = 4$.

7.8.6.2.2. Механизмы разложения

Механизм разложения фолата зависит от его формы витамина и химического окружения. Как мы уже отмечали, разложение фолата обычно сопровождается изменениями связи C^9–N^{10} и/или птеридиновой циклической системы. В фолиевой кислоте, H_4- и H_2-фолате в присутствии окислителей или восстановителей связь C^9–N^{10} может расщепляться с образованием неактивных продуктов [97]. Растворенный диоксид серы может вызвать распад некоторых фолатов; такой же способностью обладают и некоторые присутствующие в пище восстановители. Лишь незначительная часть H_4- и H_2-фолатов переходит в фолиевую кислоту за счет прямого окисления.

Хорошо известно, что окислительное расщепление H_4-, H_2-фолата и в меньшей степени фолиевой кислоты приводит к образованию неактивных в витаминном отношении продуктов (парааминобензоилглутамата и птерина) (рис. 7.36). Механизм окисления и структура птерина, образующегося в разультате окислительного разложения H_4-фолата, зависят от значения pH.

Основная природная форма фолата во многих продуктах (5-метил-H_4-фолат) может разлагаться с образованием не менее двух соединений (рис. 7.37) [115]. Первым был определен сохраняющий витаминную активность 5-метил-5,6-дигидрофолат (5-метил-H_2-фолат), поскольку под действием слабых восстановителей (тиолов или аскорбата) он может легко переходить обратно в 5-метил-H_4-фолат. В кислой среде связь C^9–N^{10} в 5-метил-H_2-фолате может разрушаться, что приводит к потере витаминной активности. Имеются данные о том, что птеридин способен перегруппировываться с образованием пиразино-*s*-триазина [73,

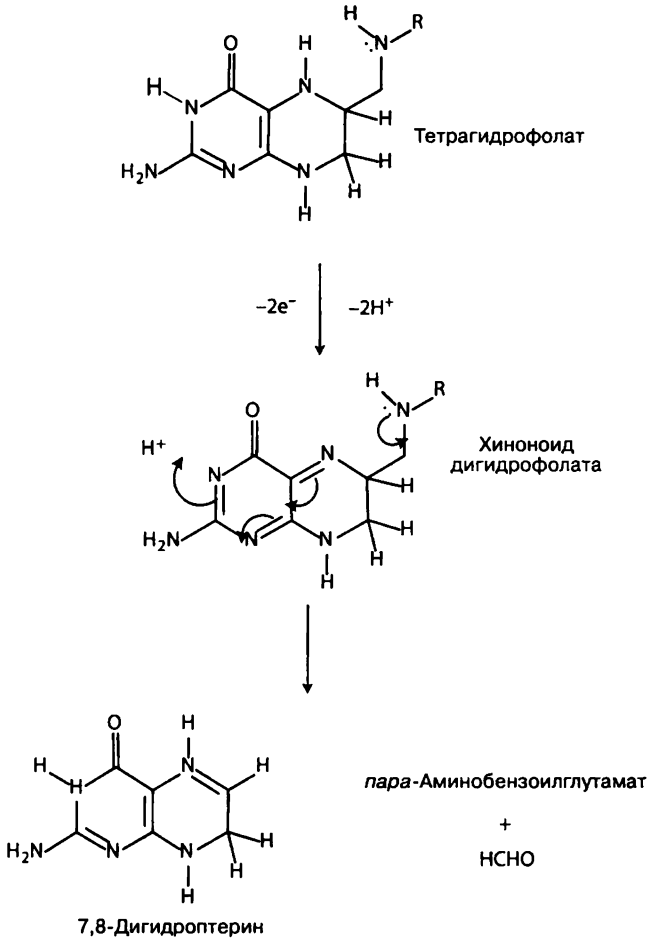


Рис. 7.36. Предположительный механизм окислительного разложения H_4-фолата. По [115]

115]. Другим продуктом разложения 5-метил-H_4-фолата, причем в некоторых пищевых и других биологических системах — основным, по-видимому, является 4α-гидрокси-5-метил-H_4-фолат. Многие аспекты химического процесса распада 5-метил-H_4-фолата до сих пор не ясны.

В работе [9] было показано, что окисление 5-метил-H_4-фолата существенно зависит от значения pH. Стабильность этого соединения, определявшаяся по поглощению кислорода, при снижении pH с 6 до 4 (в диапазоне, соответствующем области протонирования атома азота N^5) увеличивалась. Несколько иные данные были получены авторами работы [100], но о причинах, приведших к противоречивым результатам, не сообщается.

В некоторых продуктах растительного и животного происхождения около одной трети от общего содержания фолата составляет 10-формил-H_4-фолат. Его окислительное разложение может проходить по пути окисления птеридинового фрагмента с образованием 10-формил-H_2-фолата или 10-формилфолата, или по пути окислительного распада до птерина и N-формил-*p*-аминобензоилглутамата (рис. 7.38). 10-формил-H_2-фолат и 10-формилфолат сохраняют витаминные свойства, тогда как продукты распада ими не обладают. Обнаружение 10-формил-H_2-фолата и 10-формилфолата в различных пищевых продуктах [84, 110] свидетельствует, что окисление 10-формил-H_4-фолата в ходе хранения, промышленной переработки и кулинарной обработки продуктов протекает довольно легко. Факторы, определяющие образование тех или иных продуктов окисления, до сих пор не установлены, но в отличие от 10-формил-H_4-фолата 5-формил-H_4-фолат очень стабилен при повышенных температурах и в присутствии окислителей.

7.8.6.2.3. Факторы, влияющие на стабильность фолата

Зависимости стабильности фолатов в буферных растворах от значения pH, концентрации кислорода и температуры изучались в ходе многих исследований, однако их стабильность в сложных пищевых системах менее изучена.

Наиболее стабилен H_4-фолат при значениях pH 8–12 и 1–2, а наименее стабилен он при pH 4–6, но все-таки даже при наиболее благоприятных значениях pH H_4-фолат исключительно нестабилен. H_4-фолаты с заместителями в позиции N^5 значительно более стабильны, чем незамещенные H_4-фолаты. Это свидетельствует о том, что стабилизирующий эффект метильной группы в позиции N^5 обусловлен (по крайней мере, частично) стерическим препятствием, затрудняющим доступ кислорода или другого окислителя к птеридиновому кольцу. Стабилизирующий эффект заместителя в позиции N^5 более выражен в случае 5-формил-H_4-фолата, чем у 5-метил-H_4-фолата, причем оба этих соединения значительно более стабильны, чем H_4-фолат или 10-формил-H_4-фолат. При повышенных температурах и низких концентрациях кислорода 5-метил-H_4-фолат и фолиевая кислота характеризуются примерно одинаковой стабильностью.

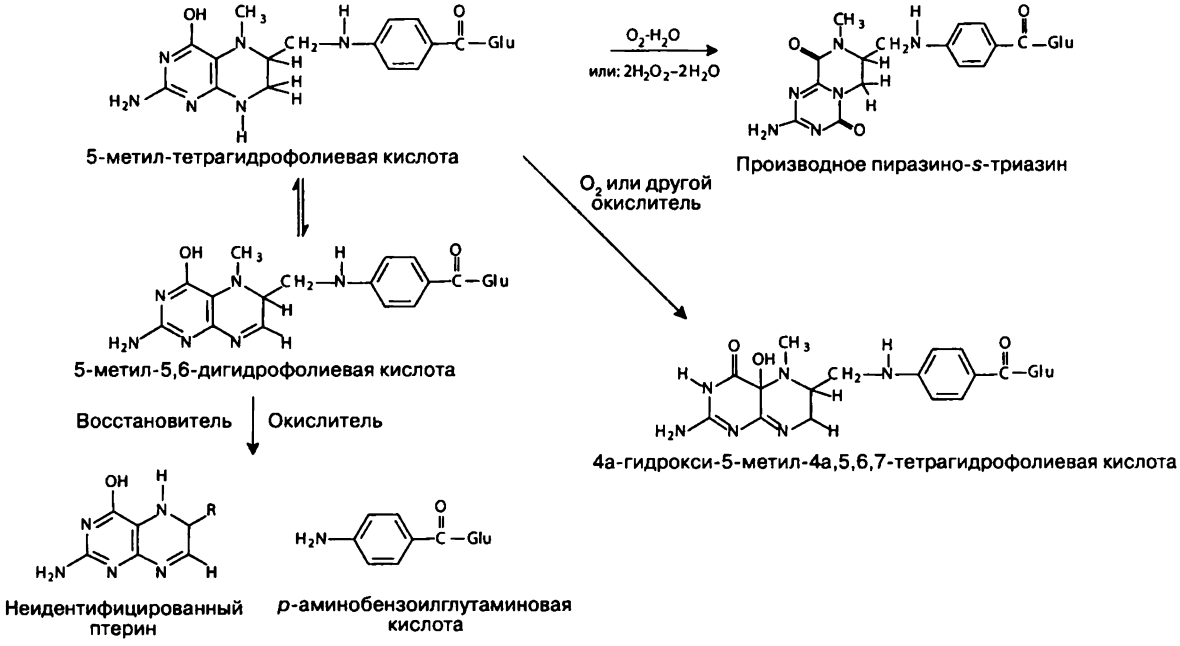


Рис. 7.37. Предположительные механизмы окислительного разложения 5-метил-H_4-фолата

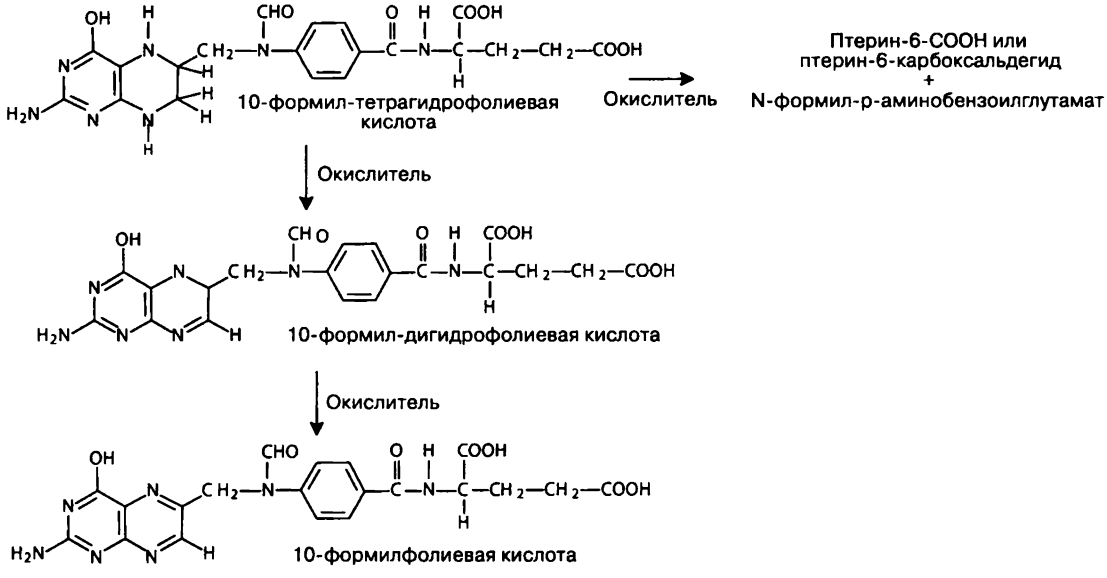


Рис. 7.38. Предположительные механизмы окислительного разложения 10-формил-H_4-фолата

Скорость окисления 5-метил-H_4-фолата зависит от концентрации растворенного кислорода и определяется уравнением второго или псевдопервого порядка. В условиях, близких к анаэробным, и в присутствии таких добавленных компонентов, как аскорбат, ионы Fe^{2+} и редуцирующие сахара, устойчивость фолиевой кислоты и 5-метил-H_4-фолата к окислению повышается. Указанные соединения, взаимодействуя с растворенным кислородом, снижают его концентрацию и повышают стабильность фолатов (рис. 7.39). Таким образом, в пище могут содержаться компоненты, влияющие на стабильность фолатов, проявляя восстановительные свойства и/или реагируя с кислородом.

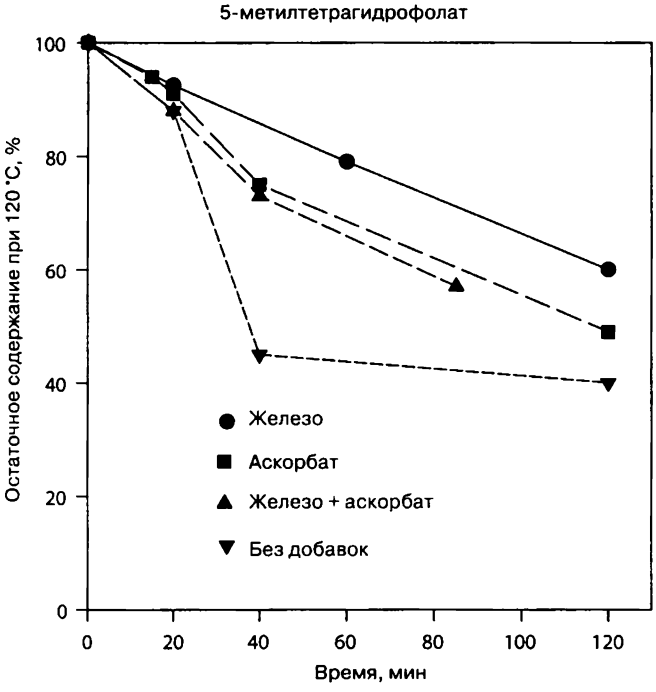


Рис. 7.39. Изменение относительного содержания 5-метил-H_4-фолата при термообработке жидкой пищевой системы, имитирующей продукт детского питания. Модельная система представляла собой раствор казеината калия и лактозы (1,5% масс./об. и 7% масс./об. соответственно) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0). В опытах с добавками их количества составили 6,65 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ или 6,38 мг аскорбата натрия на 100 см³ раствора. Начальная концентрация фолатов составляла 10 мкг/см³. По [26]

В работе [6] было показано, что константы скорости терморазложения 5-метил-H_4-фолата в нейтральном буферном растворе почти не зависят от присутствия кислорода (табл. 7.27). Как соотносятся скорости анаэробного и аэробного разложения других фолатов, пока не ясно, очевидно лишь, что потери 5-метил-H_4-фолата при термообработке пищи в условиях, близких к анаэробным, уменьшаются, но полностью не устраняются [149].

На стабильность большинства фолатов влияет также ионный состав среды. В фосфатных буферах скорость окислительного разложения фолатов возрастает, причем этот эффект может быть устранен добавлением цитрат-ионов. В фосфатных буферах зачастую присутствуют примесные ионы Cu(II), которые являются катализатором и ускоряют разложение фолата в этих буферных растворах. Известно, например, что при добавлении 0,1 ммоль Cu(II) скорость аэробного разложения 5-метил-H_4-фолата возрстает почти в 20 раз, а при введении Fe(III) — лишь в два раза [9]. В анаэробных условиях Fe(III) катализирует окисление H_4-птеридинов (H_4-фолата) до H_2-птеридинов (H_2-фолата), а затем — до полностью окисленных птеридинов (фолиевой кислоты). Установлено, что фолаты реагируют с супероксид-ионами [131, 139], хотя роль таких радикалопосредованных реакций в процессе разложения фолата пока не ясна.

Процесс разложения фолатов может ускоряться под действием некоторых реакционноспособных компонентов пищи. Как мы уже отмечали, восстановительному распаду фолатов способствует растворенный SO_2. Взаимодействие с нитритом приводит к окислительному распаду 5-метил-H_4-фолата и H_4-фолата, а продуктом реакции нитрита с фолиевой кислотой является 10-нитрозофолиевая кислота (слабый канцероген). Следует отметить, что продукты, в состав которых входит нитрит, обычно не содержат фолиевую кислоту, а концентрации других фолатов в них невелики, и благодаря этому значение реакции нитрита с фолиевой кислотой минимально. Окислительное разложение фолатов может быть вызвано и гипохлоритом, что может привести к значительным потерям фолатов в некоторых пищевых продуктах.

Таблица 7.27

Константы скорости окислительного и неокислительного разложения[a, b] 5-метил-H_4-фолата в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0. По [6]

Температура, °С	$k_{(O_2+N_2)}$, мин$^{-1}$	k_{N_2}, мин$^{-1}$	k_{O_2}, мин$^{-1}$
40	0,004 ± 0,0002	0,0005 ± 0,00001	0,004 ± 0,00005
60	0,020 ± 0,0005	0,009 ± 0,0004	0,011 ±0,0001
80	0,081 ±0,010	0,046 ± 0,003	0,035 ± 0,009
92	0,249 ± 0,050	0,094 ± 0,009	0,155 ±0,044

[a] Приведены средние значения, доверительный интервал ±95%.

[b] Значения кажущихся констант скорости первого порядка: k_{N_2} — реакции бескислородного разложения (в атмосфере азота); k_{O_2} — реакции кислородного разложения (в атмосфере кислорода); $k_{O_2+N_2}$ — реакции разложения под действием того и другого.

7.8.6.3. Усвояемость фолатов

Процессу всасывания фолатов предшествует гидролиз полиглутамильной цепи специфической пептидазой — птероилполиглутаматгидролазой, после чего с участием переносчика происходит собственно всасывание (в основном в тощей кишке) [48, 54]. Природные формы фолата усваиваются не полностью (в среднем 50% и менее) [125]. Следует отметить, что усвояемость природных фолатов в большинстве пищевых продуктов при обычных условиях (то есть при потреблении разных продуктов) определена недостоточно точно. Средняя усвояемость полиглутамилфолатов обычно составляет 70% усвояемости моноглутамилфолатов, что предполагает наличие скорость-лимитирующей стадии деконъюгации в кишечнике. Ранее в работе [20] высказывалось предположение, что усвояемость фолиевой кислоты, добавленной в зерновые продукты, составляет не более 30–60%, однако поздее было показано, что ее биодоступность из этих продуктов намного выше [111].

К факторам, снижающим усвояемость фолатов, можно отнести:

влияние пищевого матрикса, заключающееся, в основном, в нековалентном связывании фолатов или их захвате клеточной структурой;

возможное разложение лабильных H_4-фолатов в кислой среде желудка;

неполное ферментативное превращение полиглутамилфолатов в кишечнике в усвояемые моноглутамильные формы.

Многие пищевые продукты содержат вещества, ингибирующие *in vitro* кишечную птероилполиглутаматгидролазу, однако до сих пор не ясно, как эти вещества ведут себя *in vivo*. Многие свежие фрукты, овощи и мясо содержат также активные конъюгазы, способные расщеплять полиглутамилфолаты. Гомогенизация, замораживание и оттаивание, а также некоторые другие технологические процессы, разрушающие клетки, могут приводить к высвобождению этих ферментов и ускорению процесса деконъюгации. Насколько эти процессы улучшают усвояемость фолатов, неизвестно. В отсутствие эндогенных конъюгаз деконъюгация полиглутамилфолатов в процессе технологической переработки и кулинарной обработки пищевых продуктов протекает слабо.

7.8.6.4. Методы анализа

Для определения фолатов в пищевых продуктах используют микробиологические тесты, ВЭЖХ и радиометрические методы конкурентного связывания [48]. Измерение содержания фолатов осложняется необходимостью учета всех их форм, число которых может достигать нескольких десятков при реализации всех возможных сочетаний фолатного ядра и полиглутаматной цепи различной длины. Для стабилизации фолатов в ходе экстракции и анализа необходимо использовать или аскорбат, или тиол (например, меркаптоэтанол), или аскорбат и тиол вместе.

Экстракция фолата из образцов пищевых продуктов включает следующие стадии:

1) гомогенизацию в буферном растворе, приводящую к разрушению пищевого матрикса и клеточной структуры;
2) нагревание (обычно при 100 °С) для освобождения фолата из фолат-связывающих белков, инактивации ферментов, катализирующих процессы взаимопревращения фолатов, и депротеинизации образца;
3) центрифугирование для получения прозрачного экстракта;
4) обработку птероилглутаматгидролазой (конъюгазой), если анализируются только моноглутамил- или другие низкомолекулярные фолаты. Для выделения фолатов из некоторых пищевых продуктов полезно использовать другие ферменты — протеазу или амилазу. Назрела необходимость стандартизации методов экстракции и ферментативной обработки образцов, что позволило бы сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях.

При определении фолатов традиционно используются микробиологические тесты. Они основаны на потребностях в фолатах микроорганизмов — *Lactobacillus casei, Pediococcus cerevisiae* и *Streptococcus faecium*. Штаммы *P. cerevisiae* и *S. faecium*, применяемые в официально принятом методе *AOAC* (Американской ассоциации химиков-аналитиков), редко используются при анализе пищевых продуктов, поскольку эти микроорганизмы реагируют не на все формы этого витамина, тогда как *L. casei* (при соответствующем

контроле значения pH питательной среды) одинаково восприимчивы ко всем формам фолатов. Для их определения лучше применять эту культуру. Поскольку пищевые продукты обычно содержат различные фолаты, необходимо проверять, насколько рост микроорганизмов эквивалентен общему содержанию фолатов.

В методах конкурентного связывания сравниваются процессы связывания фолата в исследуемом и стандартном (содержащем меченый фолат) образцах к фолатсвязывающему участку белка (обычно молочного). Несмотря на быстроту и удобство этих методов, их применение в анализе пищевых продуктов ограничено, так как разные формы фолата имеют неодинаковое сродство к белкам. В связи с этим результаты, полученные с использованием этих методов, плохо согласуются с микробиологическими данными с использованием *L. casei*.

Разработано также несколько ВЭЖХ-методов определения фолатов в пищевых продуктах и других биологических материалах, однако необходимо так оптимизировать стадии экстракции, предварительной ферментативной обработки и очистки образцов, чтобы хроматографические методы можно было использовать при анализе разных пищевых продуктов. Перспективным является применение аффинной хроматографии с колонкой, содержащей фолат-связывающий белок, что дает возможность получать высокоочищенный экстракт для последующего ВЭЖХ-анализа [129], с помощью которого можно определять содержание полиглутамильных фолатов или (после ферментативного деконъюгирования) моноглутамильной формы [48, 129]. ВЭЖХ-методы иногда дают заниженные по сравнению с микробиологическими (с использованием *L. casei*) результаты [84], хотя иногда и нет [110], причем что именно является причиной этих несовпадений — неэквивалентное хроматографическое измерение или недостаточная специфичность микробиологического метода — не совсем ясно. Специфичность анализа можно повысить путем совместного использования жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

Содержание фолата в пищевых продуктах изменяется в широких пределах из-за климатических различий, применения разных агротехнических приемов, методов технологической и кулинарной обработки, а также потерь вследствие вымывания и окисления фолатов. В связи с этим приводимые в справочниках данные о содержании фолата в пищевых системах следует рассматривать как очень приблизительные. Кроме того, точность многих справочных данных невысока из-за использования методов, имеющих существенные недостатки (особенно это касается методов экстракции).

7.8.7. Биотин

7.8.7.1. Структура и основные свойства

Биотин представляет собой бициклический водорастворимый витамин, участвующий в качестве кофермента в реакциях карбоксилирования и транскарбоксилирования. Существует две природные формы этого витамина — свободный *D*-биотин и биоцитин (ε-N-биотинил-*L*-лизин) (рис. 7.40) [26]. Биоцитин действует как кофермент и состоит из биотинового и лизинового фрагментов. Биоцитин входит в состав различных карбоксилаз и участвует в процессах синтеза жирных кислот. Циклическая система биотина может существовать в виде восьми стереоизомеров, однако природной биологически активной формой является только один из них — *D*-биотин. И свободный, и связанный с белками биоцитин обладает витаминной активностью при поступлении с пищей, тогда как природные продукты катаболизма биотина в тканях животных (*бис*-норбиотин и биотина сульфоксид) такой активностью не обладают. Поскольку биотин широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения, в норме дефицит его у человека встречается довольно редко.

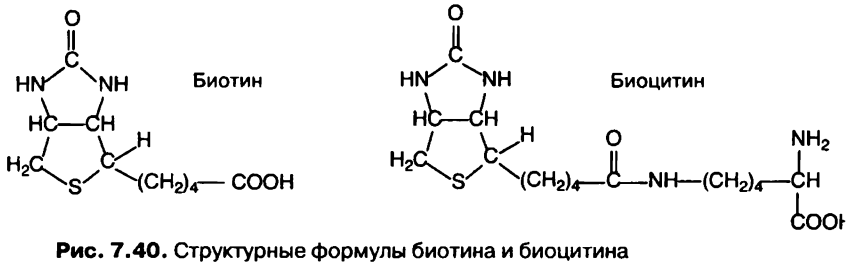


Рис. 7.40. Структурные формулы биотина и биоцитина

7.8.7.2. Стабильность

Биотин очень стоек к воздействию тепла, света и кислорода. Разлагается этот витамин лишь в сильнокислых и сильнощелочных средах, при этом протекает гидролиз амидной (–NH–C=O) связи циклической системы биотина. Пероксид водорода способен окислять биотин до биологически неактивных биотина сульфоксида или сульфона. Данные о потерях биотина при переработке и хранении пищевых продуктов приведены в работах [69, 92, 160]. Эти потери могут быть обусловлены протеканием указанных выше химических процессов или переходом свободного биотина в отвар. При хранении обогащенных зерновых продуктов в условиях низкой влажности содержание биотина незначительно снижается. В целом, биотин в пищевых продуктах достаточно хорошо сохраняется.

Стабильность биотина в грудном молоке изучалась в работе [101], где было показано, что при комнатной температуре содержание биотина в нем не изменялось в течение недели, при температуре 5 °С — в течение месяца, а при –20 °С и ниже — в течение полутора лет.

7.8.7.2. Усвояемость

Об усвояемости биотина известно немного. По-видимому, его содержание в нормальном рационе достаточно велико, и даже неполная усвояемость не оказывает какого-либо нежелательного действия. Дополнительное количество частично доступного для организма человека биотина образуется в результате бактериального синтеза в нижнем отделе ЖКТ. Основная часть биотина в пищевых продуктах присутствует в виде биоцитина, связанного белками. Из связанной формы в активную биотин переходит под действием биотинидазы, содержащейся в соке поджелудочной железы и слизистой оболочке кишечника; вместе с тем может усваиваться и некоторая часть биотинилпептидов.

Биотин совершенно не усваивается в присутствии альбумина сырых яиц, которые содержат биотинсвязывающий белок — авидин. Последний представляет собой тетрамерный гликопротеин, субъединица которого очень прочно связывает одну молекулу биотина (константа диссоциации — около 10^{-15} М), устойчивый к перевариванию. Связанный с авидином биотин практически не всасывается, так что постоянное потребление сырых яиц или яичного альбумина нарушает всасывание биотина и может привести к его дефициту. Небольшие количества авидина в рационе не приводят к нежелательным последствиям. Использование авидина или яичного альбумина в кормах для лабораторных животных также приводит к дефициту биотина. В процессе кулинарной обработки авидин денатурирует и теряет свои биотинсвязывающие свойства.

Об усвояемости биотина животными данных значительно больше, чем о его биодоступности для человека. Как следует из табл. 7.28, усвояемость биотина животными из некоторых видов кормов довольно низка [99, 126].

Таблица 7.28

Усвояемость биотина из разных видов кормов для свиней и индюков

Вид корма	Усвояемость биотина, %	
	Свиньями, по [126]	Индюшками, по [99]
Соевая мука	55,4	76,8
Мясо и костная мука	2,7	Нет данных
Рапсовая (канола) мука	3,9	65,4
Ячмень	4,8	19,2
Кукуруза	4,0	95,2
Пшеница	21,6	17,0
Добавленный биотин	93,5	Нет данных
Сорго	Нет данных	29,5

7.8.7.3. Методы анализа

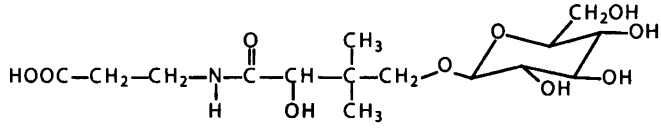
Определение содержания биотина в пищевых продуктах проводят либо микробиологическими тестами (обычно с использованием *Lactobacillus plantarum*), либо применяя авидин в качестве связывающего белка. Существуют также ВЭЖХ-методы анализа биотина. В большинстве методов для увеличения чувствитель-

ности используется стадия связывания биотина авидином. Эти методы позволяют определять содержание свободного биотина и биоцитина, причем при определении последнего его сначала необходимо выделить из протеинсвязанной формы, для чего используется ферментативный или кислотный гидролиз [101, 160]. Поскольку в сильнокислой среде биотин нестабилен, использовать кислоту для гидролиза следует осторожно [101]. Определению биотина могут мешать присутствующие в животных тканях и моче человека биологически неактивные аналоги, такие как *бис*-норбиотин и биотина сульфоксид, которые могут завышать результаты при использовании авидинсвязывающих и некоторых микробиологических методов. Решить эту проблему позволяет раздельное определение производных биотина ВЭЖХ-методами.

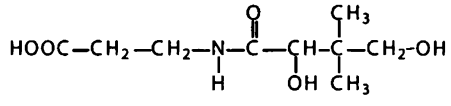
7.8.8. Пантотеновая кислота

7.8.8.1. Структура и основные свойства

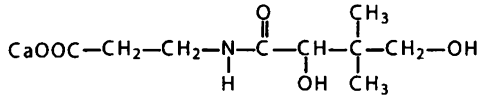
Пантотеновая кислота, или *D*-N-(2,4-дигидрокси-3,3-диметил-бутирил-β-аланин) — это водорастворимый витамин, состоящий из β-аланина, соединенного амидным мостиком с 2,4-дигидрокси-3,3-диметилбутановой (пантоевой) кислотой (рис. 7.41). Пантотеновая кислота участвует в процессах метаболизма как компонент кофермента (коэнзима) А и как ковалентно связанная простетическая группа (без аденозильного фрагмента коэнзима А) белка-переносчика ацильных остатков в синтезе жирных кислот. Образование тиоэфирного производного коэнзима А с органическими кислотами способствует протеканию целого ряда метаболических процессов в ряде реакций биосинтеза и катаболических реакций, главным образом присоединению или отщеплению ацильных групп. Пантотеновая кислота необходима для всех живых организмов и содержится во многих продуктах — мясе, злаках, яйцах, молоке и свежих овощах. Этот витамин присутствует в пищевых продуктах в основном в форме коэнзима А, большая часть которого существует в виде тиоэфирных производных органических кислот. Хотя аналитических данных о соотношении свободной пантотеновой кислоты и ее связанной формы в виде коэнзима А в пищевых продуктах довольно мало, установлено, что свободная пантотеновая кислота составляет лишь половину от общего ее содержания в говядине и горохе [59]. Полностью усвояемым источником пантотеновой кислоты является коэнзим А, поскольку последний переходит в нее в тонкой кишке под действием щелочной фосфатазы и амидазы. Всасывание пантотеновой кислоты протекает с участием переносчика.



Пантотенил-β-*D*-глюкозид



Пантотеновая кислота



Пантотенат кальция

Рис. 7.41. Структурные формулы различных форм пантотеновой кислоты

Синтетическая пантотеновая кислота в форме пантотената кальция используется для обогащения пищевых продуктов и входит в состав биологически активных добавок к пище. Кальциевая соль представляет собой белое кристаллическое вещество, более стабильное и менее гигроскопичное, чем свободная кислота. В качестве добавки в корма для животных используют также соответствующий пантотеновой кислоте спирт пантенол, который применяют и в качестве ингредиента некоторых шампуней, причем для придания им скорее определенных физических (смазывающих), чем нутритивных свойств.

7.8.8.2. Стабильность и процессы разложения

Пантотеновая кислота наиболее стабильна в слабокислых средах (pH 5–7) и мало разлагается при хранении пищевых продуктов, особенно при низких значениях активности воды. Потери при термо- и кулинарной обработке изменяются пропорционально интенсивности обработки и степени вымывания, достигая

30–80%. Хотя механизм термического разложения пантотеновой кислоты не совсем ясен, наиболее вероятным представляется кислотный или щелочной гидролиз связи между β-аланином и 1,4-дигидрокси-3,3-бутирилкарбоновой кислотой. Молекула пантотеновой кислоты характеризуется малой реакционной способностью и почти не реагирует с другими компонентами пищи. Коэнзим А способен образовывать смешанные дисульфиды с другими тиолами, содержащимися в пище, но это почти не сказывается на общем содержании усвояемой пантотеновой кислоты.

Процесс разложения пантотеновой кислоты при повышенных температурах описывается уравнением первого порядка [59]. Константы скорости разложения свободной пантотеновой кислоты при снижении pH с 6,0 до 4,0 увеличиваются, а энергия активации при этом уменьшается. Пантотеновая кислота разлагается значительно медленнее, чем другие лабильные нутриенты, в частности, тиамин. Потери пантотеновой кислоты в пищевых продуктах, зафиксированные другими исследованиями, были связаны преимущественно с ее переходом в отвар, а не с разложением.

7.8.8.3. Усвояемость

Средняя усвояемость пантотената из смешанного рациона составляет примерно 50% [141]. Поскольку потребление пантотеновой кислоты находится на адекватном уровне, такая ее неполная усвояемость обычно не приводит к нежелательным последствиям. Коферментные формы этого витамина также легко перевариваются и усваиваются.

7.8.8.4. Методы анализа

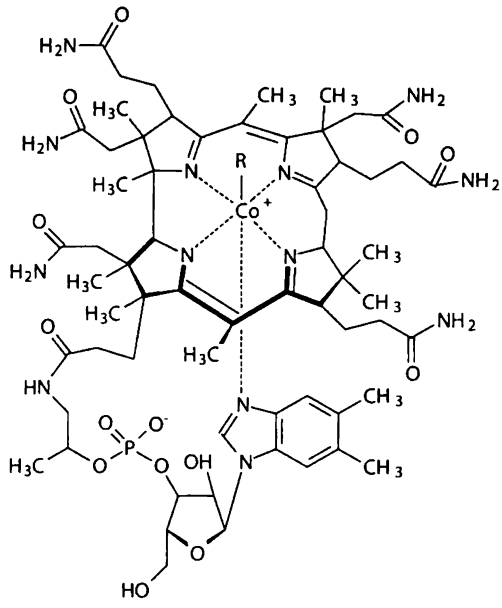
Для определения пантотеновой кислоты применяют в основном микробиологические тесты (с использованием *L. plantarum*) и радиоиммунные методы [156]. Ключевой стадией, определяющей надежность измерения содержания пантотеновой кислоты, является предварительная обработка, необходимая для высвобождения витамина из его связанных форм, для чего используют различные комбинации протеаз и фосфатаз.

7.8.9. Витамин B_{12}

7.8.9.1. Структура и основные свойства

Понятие и термин «витамин B_{12}» объединяют группу соединений, называемых кобаламинами, витаминная активность которых подобна активности цианокобаламина. Кобаламины имеют тетрапиррольную (корриноидную) структуру и содержат ион кобальта, связанный координационными связями с четырьмя пиррольными атомами азота. Пятую ковалентную координационную связь кобальт образует с азотом диметилбензимидазольного фрагмента, а шестая позиция может быть занята цианидной, 5′-деоксиаденозильной и метильной группами, а также глутатионом, водой, гидроксил-ионом или другими лигандами, такими как нитрит, аммоний или сульфит (рис. 7.42). Все формы витамина B_{12}, приведенные на рис. 7.42, обладают витаминной активностью. Коммерческая синтетическая форма витамина B_{12} (цианокобаламин), используемая для обогащения пищевых продуктов и в биологически активных добавках к пище, очень стабильна. Коферментными формами витамина B_{12} являются метилкобаламин и 5′-дезоксиаденозилкобаламин. Метилкобаламин в качестве кофермента метионинсинтазы принимает участие в переносе метильной группы с 5-метил-тетрагидрофолата, тогда как 5′-дезоксиаденозилкобаламин выполняет роль кофермента в реакции перегруппировки, катализируемой метилмалонил-CoA-мутазой [136]. В пищевых продуктах цианокобаламин практически не встречается. Обнаружение витамина B_{12} в виде цианокобаламина фактически было артефактом и объяснялось особенностями процесса выделения. Кристаллический цианокобаламин и его водный раствор имеют бледно-красный цвет, что ограничивает возможности его добавления к некоторым пищевым продуктам, не имеющим яркой окраски (например, к пшеничному хлебу).

В отличие от других витаминов, синтезирующихся в основном растениями, кобаламины продуцируются только микроорганизмами. Сообщается, что некоторые бобовые способны усваивать небольшие количества B_{12}, продуцируемого бактериями, живущими на корневых клубеньках, однако в семена этот витамин почти не поступает [103]. В большинстве продуктов растительного происхождения витамин B_{12} отсутствует, если только они не загрязнены фекальными материалами (например, из удобрений) [65, 66]. В животных



Лиганд, R	Форма B_{12}
-CN	Цианокобаламин
-OH	Гидроксикобаламин
$-H_2O$	Аквакобаламин
-глутатион	Глутатионилкобаламин
$-CH_3$	Метилкобаламин
-5'-дезоксиаденозин	5'-дезоксиаденозилкобаламин

Рис. 7.42. Структурная формула различных форм витамина B_{12}

тканях витамин B_{12} находится преимущественно в коферментных формах (в виде метилкобаламина и 5'-дезоксиаденозилкобаламина), а также в форме аквакобаламина.

В настоящее время известно около 20 природных аналогов витамина B_{12}. Часть из них в организмах млекопитающих неактивна, некоторые могут быть антагонистами витамина B_{12}, а другие обладают частичной витаминной активностью, но зачастую плохо всасываются.

7.8.9.2. Стабильность и процессы разложения

Установлено, что в ходе большинства видов промышленной переработки пищевых продуктов, их консервировании и хранении потери витамина B_{12} невелики. Так, потери цианокобаламина, которым обогащали сухие зерновые завтраки, составили в среднем 17% при переработке и еще 17% — в ходе хранения при комнатной температуре в течение 12 мес. [137]. После кратковременной высокотемпературной (*HTST*) обработки молока в нем остается 96% витамина B_{12}, и почти такое же количество (более 90%) остается после ультравысокотемпературной (УВТ) обработки [43]. При хранении молока в холодильной камере витамин B_{12} очень хорошо сохраняется, однако его потери при хранении УВТ-молока вплоть до 90 сут при комнатной температуре могут достигать 50% [17]. После 13-минутной стерилизации молока при температуре 120 °C остается лишь 23% витамина B_{12} [76], а предварительное концентрирование (например, для получения сгущенного молока) приводит к еще большим потерям. Все это свидетельствует, что при длительной высокотемпературной обработке продуктов возможны большие потери витамина B_{12} при нейтральных или близких к нейтральным значений pH. В блюдах, разогреваемых в микроволновых печах, обычно остается 79–100% витамина B_{12}.

Известно, что разложение витамина B_{12} ускоряется аскорбиновой кислотой, но этот эффект не имеет большого практического значения, поскольку продукты, богатые витамином B_{12}, обычно не содержат аскорбиновой кислоты в больших количествах. В работе [35] было показано, что добавки аскорбата или эриторбата, использовавшиеся в производстве ветчины, не повлияли на содержание в ней витамина B_{12}. Тиамин и никотинамид могут ускорять разложение витамина B_{12} в растворах, но практическое значение этого явления пока неясно.

Детальный механизм разложения витамина B_{12} неизвестен, что обусловлено в основном сложностью молекулы и очень низкой концентрацией этого витамина в пищевых продуктах. Известно, что при фотохимическом разложении коферментных форм витамина B_{12} образуется аквакобаламин. Этот процесс влияет на метаболизм и функции витамина B_{12}, но не на его общую витаминную активность, так как аквакобаламин обладает свойствами витамина. Наиболее стабилен кобаламин при значениях pH 4–7. В кислой среде происходит отщепление нуклеотидного фрагмента, причем в сильнокислых средах происходит дальнейшая фрагментация. В кислых и щелочных средах протекает гидролиз амидов с образованием биологически неактивных производных кобаламина.

Для кобаламинов характерны взаимопревращения посредством обмена лигандов, связанных с атомом кобальта. Например, взаимодействие аквакобаламина с бисульфитом приводит к образованию сульфито-

кобаламина; кроме того, сходные реакции имеют место с образованием кобаламинов, замещенных аммонием, нитритом и гидроксил-ионом, но все эти реакции практически не влияют на активность витамина B_{12} в пищевых продуктах.

7.8.9.3. Усвояемость

Биодоступность витамина B_{12} изучалась главным образом в связи с проявлениями дефицита этого витамина, обусловленного его недостаточной усвояемостью. О влиянии состава пищи на усвояемость витамина B_{12} известно очень мало. В ходе нескольких исследований было установлено, что пектин и, возможно, подобные ему камеди снижают усвояемость кобаламинов у крыс. Значение этого эффекта для человека неизвестно. Хотя в большинстве растений витамин B_{12} практически отсутствует, в некоторых водорослях он содержится в значительных количествах, однако водоросли считаются не очень хорошим источником витамина B_{12} из-за очень плохой усвояемости присутствующих в них форм этого витамина [25].

У обычного человека усвояемость витамина B_{12} из яиц составляет менее половины усвояемости цианокобаламина, введенного на голодный желудок [33]. Аналогичные результаты были получены при изучении биодоступности витамина B_{12} из рыбы и мяса [32, 34]. Некоторые люди маргинально обеспечены витамином B_{12} вследствие плохого переваривания белков и неполного высвобождения кобаламинов из пищевого матрикса даже при нормальном всасывании чистого кобаламина [18]. Особенно часто мальабсорбция витамина B_{12} из пищи наблюдается у пожилых. Недавние исследования показали, что цианокобаламин, внесенный в хлеб или молоко, хорошо всасывается у пожилых людей, что означает, что обогащение этих продуктов витамином B_{12} дает положительный эффект [122].

7.8.9.4. Методы анализа

Содержание витамина B_{12} в пищевых продуктах определяют преимущественно микробиологическими тестами (с использованием *Lactobacillus leichmannii*) или радиоконкурентными методами [38]. Хотя различные формы витамина B_{12} можно разделить хроматографически, ВЭЖХ-методы не очень пригодны для анализа кобаламинов из-за очень низкой концентрации последних в пищевых продуктах. Прежние радиоконкурентные методы, применявшиеся при анализе клинических материалов и пищевых продуктов, не отличались высокой точностью, поскольку используемый связывающий белок мог связывать как активные, так и биологически неактивные формы витамина. Специфичность этих методов удалось существенно повысить благодаря применению витамин B_{12}-связывающего белка, названного «внутренним фактором» и получаемого из свиных желудков, так как этот белок связывает только биологически активные формы витамина. На результаты микробиологических тестов с использованием *L. leichmannii* может оказывать влияние присутствие больших количеств деоксирибонуклеозидов.

Перед анализом образцы пищевых продуктов гомогенизируют в буферном растворе и инкубируют при температуре около 60 °C в присутствии папаина (протеазы) и цианида натрия. Это позволяет высвободить связанные с белками формы витамина B_{12} и перевести все формы кобаламина в наиболее стабильный цианокобаламин. Получение только одной формы витамина B_{12} в виде цианокобаламина упрощает также саму процедуру анализа, устраняя возможные различия в отклике, связанные со сложным составом смеси кобаламинов.

7.9. Условно эссенциальные витаминоподобные соединения

7.9.1. Холин и бетаин

Холин (рис. 7.43) во всех живых организмах присутствует в виде свободного соединения, а также входит в состав ряда клеточных веществ в виде фосфатидилхолина (важнейшего источника холина в пище), сфингомиелина и ацетилхолина. Несмотря на то что холин синтезируется в организме человека и других млекопитающих, появляется все больше данных о необходимости его адекватного поступления в организм с пищей [45], позволивших установить нормы потребления холина [70]. Вместе с тем следует отметить, что неадекватное потребление холина здоровыми людьми, питающимися разнообразно, встречается довольно редко, что объясняется высоким содержанием холина во многих пищевых продуктах (собствен-

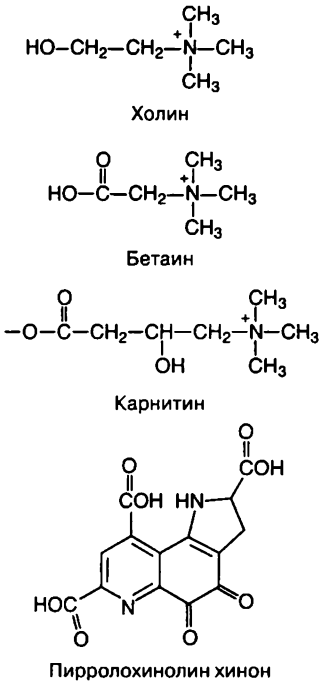


Рис. 7.43. Структурные формулы холина, бетаина, карнитина и пирролохинолин хинона

но холина, фосфохолина, компонентов мембран сфингомиелина и фосфатидилхолина). Для обогащения продуктов детского питания используют хлорид и битартрат холина. Для обогащения других продуктов холин обычно не используют, за исключением применения, например, фосфатидилхолина в качестве эмульгатора. Стабильность холина очень высока, он практически не разлагается при переработке, кулинарной обработке и хранении пищевых продуктов.

Бетаин (N-триметилглицин, см. рис. 7.43) является продуктом метаболического распада холина. Бетаин поступает с пищей, его содержание особенно велико в свекле, пшенице, шпинате и креветках [159]. В метаболических процессах бетаин выступает в качестве альтернативы 5-метил-H_4-фолату в реакции превращения гомоцистеина в метионин в синтезе белков, а также (после образования S-аденозилметионина) — во многих реакциях метилирования в клетке. Эти реакции помогают сохранить метионин, контролировать уровень гомоцистеина и осуществлять S-аденозилметионин-зависимые реакции метилирования независимо от уровня поступления фолата. Поскольку бетаин содержится во многих пищевых продуктах и продуцируется *in vivo* из широко распространенного холина, дефицит бетаина встречается очень редко. В случае повышенного уровня гомоцистеина в плазме крови, обусловленного пищевыми или генетическими причинами, можно рекомендовать периодический прием бетаина вместе с витаминами (B_6, B_{12} и фолиевой кислотой) для повышения степени превращения гомоцистеина в метионин.

7.9.2. Карнитин

Карнитин (см. рис. 7.43) синтезируется в организме человека, однако некоторым людям требуется его дополнительное поступление с рационом [45]. Нормы потребления карнитина еще не установлены*. В продуктах растительного происхождения карнитина почти не содержится, однако в продуктах животного происхождения его достаточно много. Карнитин участвует в переносе органических кислот через биологические мембраны и способствует таким образом метаболической утилизации и удалению этих веществ. Карнитин также ускоряет транспорт некоторых органических кислот, снижая их потенциальную токсичность для определенных клеток. В продуктах животного происхождения карнитин присутствует в свободной и ацилированной форме (в последнем случае карнитин этерифицирован по С-3 гидроксильной группе разными органическими кислотами). Карнитин очень стоек и в пищевых продуктах почти не разлагается.

Синтетический карнитин используется в медицине в виде биологически активного *L*-изомера (*D*-карнитин не обладает биологической активностью). *L*-карнитином обогащают продукты детского питания, повышая его содержание до уровня, характерного для грудного молока.

7.9.3. Пирролохинолин хинон

Пирролохинолин хинон (ПХХ, *PQQ*) представляет собой трициклический хинон (см. рис. 7.43), действующий, как считалось ранее, в качестве кофермента нескольких бактериальных оксидоредуктаз, а также лизилоксидазы и аминоксидаз млекопитающих. Позже, однако, было показано, что, скорее всего, коферментом в этих ферментах млекопитающих является не ПХХ, а 6-гидрокси-дигидроксифенилаланин хинон [60]. Хотя функции ПХХ в организмах млекопитающих неизвестны, в некоторых исследованиях было показано наличие очень низкой потребности в ПХХ для крыс и мышей, по-видимому, обусловленной его необходимостью для образования соединительных тканей и нормального воспроизводства [81]. Благодаря широкой распространенности ПХХ и его синтезу кишечными бактериями, возникновение его спонтанного дефицита у грызунов и человека маловероятно.

* В РФ установлен адекватный уровень его суточного потребления для взрослых, составляющий 300 мг/сут. — *Примеч. науч. ред.*

7.9.4. Кофермент Q_{10}

Кофермент (коэнзим) Q_{10}, известный также как убихинон, является замещенным хиноном, основной биологической функцией которого является участие в качестве кофермента в системе переноса электронов в митохондриях [24]. Хиноновый фрагмент коэнзима Q_{10} обеспечивает *in vivo* его окислительно-восстановительные функции путем осуществления двух последовательных процессов одноэлектронного восстановления (рис. 7.44). Длинная изопреноидная боковая цепь придает соединению хорошую растворимость в липидах и, по-видимому, является мембранным якорем в ходе протекания в митохондриях окислительно-восстановительных реакций. Убихинольная форма, обладающая сильными антиоксидантными свойствами, является частью системы защиты мембранных липидов от окисления и может быть важна в некоторых пищевых системах.

Коэнзим Q_{10} не относится к эссенциальным нутриентам, поскольку в организме человека он синтезируется в достаточных количествах, однако пищевые продукты (и растительного, и животного происхождения) также являются частичными источниками усвояемого коэнзима Q_{10}. В настоящее время еще не ясно, необходим ли или желателен дополнительный прием коэнзима Q_{10} для поддержания здоровья человека. Терапевтическое применение коэнзима Q_{10} в виде вспомогательной добавки может быть полезно для больных некоторыми формами онкологических и кардиологических заболеваний, болезнью Паркинсона, для нейтрализации антагонистического действия некоторых лекарственных средств, в также при ряде наследственных нарушений митохондриального метаболизма.

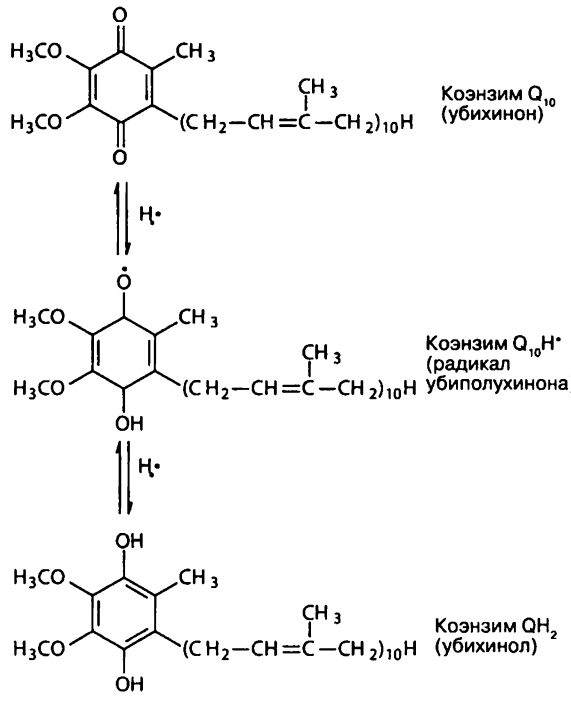


Рис. 7.44. Структурная формула коэнзима Q_{10}

7.10. Сохранность витаминов в пищевых продуктах

Потери нутриентов на пути продукта от поля (фермы) до нашего стола неизбежны и происходят в разной степени на всех стадиях обработки сырья, приготовлении и при хранении готовых пищевых продуктов при промышленной переработке, в торговой сети и дома. За оптимизацию сохранности нутриентов отвечает, прежде всего, пищевая промышленность, но выигрывают от этого и производители, и потребители. Нельзя не обращать внимания на проблемы повышения сохранности нутриентов и правильного обращения с продуктами в торговой сети и в домашних условиях.

Многие меры по повышению сохранности витаминов основаны на учете их химических и физических свойств. Например, использование подкислителей (если они совместимы с конкретным продуктом) позволяет повысить стабильность тиамина и аскорбиновой кислоты, однако стабильность некоторых фолатов в кислой среде снижается. Этот пример свидетельствует, насколько сложно применять этот метод на практике. Переработка и кулинарная обработка в отсутствие или при малых концентрациях кислорода и жидкости уменьшает окисление и экстракцию (переход в отвар) витаминов и минеральных веществ. Кратковременная высокотемпературная (*HTST*) обработка многих пищевых продуктов приводит к меньшим потерям витаминов по сравнению с традиционной тепловой обработкой для инактивации микроорганизмов. Кроме того, повышению сохранности витаминов могут способствовать некоторые комбинации ингредиентов — например, в присутствии природных антиоксидантов стабильность многих витаминов увеличивается.

Далее мы рассмотрим некоторые примеры, позволяющие снизить потери нутриентов. Подробнее о них см. работы [75, 91].

7.10.1. Оптимизация режимов тепловой обработки

Потери нутриентов зачастую происходят при тепловой обработке, осуществляемой для увеличения срока годности продукта. Эти потери часто объясняются как химическим разложением, так и переходом в отвар. Кинетика и термодинамика инактивации микроорганизмов и распада витаминов существенно различаются. Термическая инактивация микроорганизмов связана в основном с денатурацией эссенциальных макромолекул и характеризуется большими энергиями активации (обычно 200–600 кДж/моль). Наоборот, энергии активации процессов разложения витаминов, в основном, значительно ниже (20–100 кДж/моль). Таким образом, термозависимости инактивации микроорганизмов и разложения витаминов существенно различаются. Другими словами, скорость инактивации микроорганизмов при повышении температуры увеличивается существенно быстрее. Это стало толчком к разработке новых методов кратковременной высокотемпературной обработки (*HTST*), минимизирующих потери витаминов. В ставшей классической работе [142] использовались различные способы термообработки, обусловливающие одну и ту же степень инактивации микроорганизмов, и было показано, что при использовании оптимального температурно-временного режима можно, по крайней мере, в полтора раза увеличить сохранность тиамина при термообработке горохового пюре. Аналогичных эффектов можно ожидать и для других менее лабильных витаминов (по сравнению с тиамином) в продуктах с низкой кислотностью.

7.10.2. Прогнозирование потерь витаминов

Для прогнозирования потерь витаминов необходимо знать кинетические закономерности процесса терморазложения тех форм витаминов, которые присутствуют в данном пищевом продукте. Различные формы витаминов в разных пищевых продуктах и условиях ведут себя по-разному. Прежде всего, следует определить, требуются ли знания кинетики разложения иследуемого витамина в целом или нужно знать кинетику отдельных его форм [55]. Исследования процессов разложения витаминов следует проводить в условиях, максимально приближенных к технологическим или условиям хранения. Как отмечается в работах [67, 89], кинетические эксперименты необходимо проводить при нескольких температурах, что позволит рассчитать константы скорости и зеачения энергии активации процесса. Кроме того, экспериментальные условия должны обеспечивать достаточно существенные потери витамина (это необходимо для точного определения кинетических параметров) [67]. В связи с этим процессы разложения обычно изучают при высоких температурах. Поскольку в реальных условиях температура хранения и транспортировки продуктов меняется, при построении кинетических моделей разложения витаминов эти скачки температур следует учитывать [46, 85].

7.10.3. Влияние упаковки

Упаковка влияет на стабильность витаминов в нескольких аспектах. В консервированных продуктах (твердых или эмульсионной природы), где теплота передается в основном кондуктивным образом (теплопроводностью), следует ожидать больших потерь нутриентов, чем при теплопередаче конвекцией (особенно в крупных контейнерах). Эти различия обусловлены тем, что термообработка проводится с учетом самой непрогреваемой части продукта (при кондуктивном нагреве ею является геометрический центр контейнера). Такие потери сводятся к минимуму, если использовать емкости с большим отношением площади поверхности к массе, то есть небольшие банки и нецилиндрическую упаковку типа гибких пакетов [118]. Последние для заполнения требуют меньше жидкости, что является преимуществом, поскольку минимизируется переход нутриентов в отвар.

Большое влияние на сохранность витаминов в пищевом продукте в процессе хранения оказывает проницаемость упаковочных материалов. Показано, что стабильность аскорбиновой кислоты в соках и фруктовых напитках существенно повышается, если упаковочный материал обладает низкой проницаемостью для кислорода [74]. Кроме того, использование светонепроницаемых упаковочных материалов препятствует фотохимическому разложению фотолабильных витаминов — витамина А и рибофлавина, а также других нутриентов, чувствительных к действию света.

7.11. Краткое резюме

Витамины представляют собой органические химические вещества, сильно различающиеся по своей стабильности, реакционной способности, чувствительности к внешним условиям и влиянию на другие компоненты пищевых продуктов. Прогнозировать общую сохранность витаминов в пище и механизмы их разложения в конкретных условиях очень трудно, поскольку большинство витаминов существует в различных формах. После завершения работы с этой главой мы рекомендуем вернуться к табл. 7.1, в которой представлены основные свойства всех витаминов.

Литература

1. Nomenclature policy: generic descriptions and trivial names for vitamins and related compounds / American Institute of Nutrition // *J. Nutr.*, 1987, 120, p. 12–19.
2. Ames S. R. Bioassay of vitamin A compounds // *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 1965, 24, p. 917–923.
3. Anderson R. H., Maxwell D. L., Mulley A. E., Fritsch C. W. Effects of processing and storage on micronutrients in breakfast cereals // *Food Technol.*, 1976, 30, p. 110–114.
4. The nutritive quality of processed food. General policies for nutrient addition // *Nutr. Rev.*, 1982, 40, p. 93–96.
5. Arabshahi A., Lund D. B. Thiamin stability in simulated intermediate moisture food // *J.Food Sci.*, 1988, 53, p. 199–203.
6. Barrett D. M., Lund D. B. Effect of oxygen on thermal degradation of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid // *J. Food Sci.*, 1989, 54, p. 146–149.
7. Bauernfeind J. C., Lachance P. A. *Nutrient Additions to Food. Nutritional, Technological and Regulatory Aspects.* – Trambull, CT: Food and Nutrition Press, Inc., 1992.
8. Bergstrom L. Nutrient data banks for nutrient evaluation in foods // *Nutritional Evaluation of Food Processing* / E. Karmas, R. S. Harris (eds). – 3rd ed. – NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1988. – P. 745–764.
9. Blair J. A., Pearson A. J., Robb A. J. Autoxidation of 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate // *J. Chem. Soc. Perkin Tran. II*, 1975, p. 18–21.
10. Bode A. M., Cunningham L., Rose R. C. Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography // *Clin. Chem.*, 1990, 36, p. 1807–1809.
11. Bowers J. A., Craig J. Components of vitamin B_6 in turkey breast muscle // *J. Food Sci.*, 1978, 43, p. 1619–1621.
12. Brown E. D., Micozzi M. S., Craft N. E. et al. Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified β-carotene // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, 49, p. 1258–1265.
13. Buettner G. R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals // *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 1988, 16, p. 27–40.
14. Buettner G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α-tocopherol, and ascorbate // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 300, p. 535–543.
15. Burton G. W., Ingold K. U. β-Carotene: unusual type of lipid antioxidant // *Science*, 1984, 224, p. 569–573.
16. Burton G. W., Traber M. G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, andbioavailability // *Ann. Rev. Nutr.*, 1990, 10, p. 357–382.
17. Burton H., Ford J. E., Franklin J. G., Porter J. W. G. Effects of repeated heat treatments on the levels of some vitamins of the B-complex in milk // *J. Dairy Res.*, 1967, 34, p. 193–197.
18. Carmel R., Sinow R. M., Siegel M. E., Samloff I. M. Food cobalaminmalabsorption occurs frequently in patients with unexplained low serum cobalamin levels // *Arch. Intern. Med.*, 1988, 148, p. 1715–1719.
19. Chandler L. A., Schwartz S. J. HPLC separation of *cis-trans* carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables // *J. Food Sci.*, 1987, 52, p. 669–672.

19a. Charmichael E. C, Geldart T. S., McDonald R. S. et al. Kinetics and mechanism of the reversible ring-opening of thiamine and related thiazolium ions in aqueous solution // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1997, 2, p. 2609–2619.

20. Colman N., Green R., Metz J. Prevention of Mate deficiency by food fortification. II. Absorption of folic acid from fortified staple foods // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1975, 28, p. 459–464.
21. Cort W. M., Borenstein B., Harley J. H., Osadca M., Schemer J. Nutrient stability of fortified cereal products // *Food Technol.*, 1976, 30, p. 52–62.
22. Cort W. M., Vicente T. S., Waysek E. H., Williams B. D. Vitamin E content of feedstuffs determined by high-performance liquid chromatography // *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, p. 1330–1333.
23. Coursin D. B. Convulsive seizures in infants with pyridoxine deficient diet // *J. Am. Med. Assoc.*, 1954, 154, p. 406–408.
24. Crane F. L. Biochemical functions of coenzyme Q10 // *J. Am. Coll. Nutr.*, 2001, 20, p. 591–598.
25. Dagnelie P. C., van Staveren W. A., van den Berg H.. Vitamin B_{12} from algae appears not to be bioavailable // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 53, p. 695–697.
26. Day B. P. F., Gregory J. F. Thermal stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in liquid model food systems // *J. Food Sci.*, 1983, 48, p. 581–587, 599.

27. Dellamonica E. S., McDowell P. E. Comparison of β-carotene content of dried carrots prepared by three dehydrated processes // *Food Technol.*, 1965, 19, p. 1597–1599.
28. DellaPenna D. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health // *Science,* 1999, 285, p. 375–379.
29. Dennison D. B., Kirk J. R. Oxygen effect on the degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system // *J. Food Sci.*, 1978, 43, p. 609–618.
30. Dennison, D., Kirk J., Bach J., Kokoczka P., Heldman D. Storage stability of thiamin and riboflavin in a dehydrated food system // *J. Food Process. Preserv.*, 1977, 1, p. 43–54.
31. Deutsch J. C., Kolhouse J. F. Ascorbate and dehydroascorbate measurements in aqueous solutions and plasma determined by gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Chem.*, 1993, 65, p. 321–326.
32. Doscherholmen A., McMahon J., Economon P. B_{12} absorption from fish // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1981, 167, p. 480–484.
33. Doscherholmen A., McMahon J., Ripley D. Vitamin B_{12} absorption from eggs // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 149, p. 987–990.
34. Doscherholmen A., McMahon J., Ripley D. B_{12} assimilation from chicken meat // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1978, 31, p. 825–830.
35. Douglass J. S., Morrow F. D., Ono K., Keeton J. T., Vanderslice J. T., Post R. C., Willis B. W. Impact of sodium ascorbate and sodium erythorbate use in meat processing on the vitamin B_{12} contents of cured ham // *J. Food Sci.*, 1989, 54, p. 1473–1474.
36. Dwivedi B. K., Arnold R. G. Chemistry of thiamine degradation in food products and model systems: a review // *J. Agric. Food Chem.*, 1973, 21, p. 54–60.
37. Eitenmiller R. R., de Souza S. Niacin // *Methods of Vitamin Assay* / J. Augustin, B. P. Klein, D. A. Becker, P. B. Venugopal (eds). – 4th ed. – NY: John Wiley & Sons, 1985. – P. 385–398.
38. Ellenbogen L., Cooper B. A. Vitamin B_{12} // *Handbook of Vitamins* / L. J. Machlin (ed.). – 2nd ed. NY: Marcell Dekker, Inc., 1992. – P. 491–536.
39. Evans S. R., Gregory J. F., Kirk J. R. Thermal degradation kinetics of pyridoxine hydrochloride in dehydrated model food systems // *J. Food Sci.*, 1981, 46, p. 555–558, 563.
40. Farrer K. T. H. The thermal destruction of vitamin B_1 in foods // *Adv. Food Res.*, 1955, 6, p. 257–311.
41. Finglas P. M., Faulks R. M. Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food // *J. Micronutr. Anal.* 1987, 3, p. 251–283.
42. Ford J. E., Porter J. W. G., Thompson S. Y., Toothill J., Edwards-Webb J. Effects of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content of milk // *J. Dairy Res.*, 1969, 36, p. 447–454.
43. Frankel E. N., Huang S.-W., Kanner J., German J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions // *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, p. 1054–1059.
44. Freed M., Brenner S., Wodicka V. O. Prediction of thiamine and ascorbic acid stability in canned stored foods // *Food Technol.*, 1948, 3, p. 148–151.
45. Garrow T. A. Choline and caraitine // *Present Knowledge in Nutrition* / B. B. Bowman, R. M. Russell (eds.); International Life Sciences Institute. – 8th ed. – Washington, D.C: ILSI Press, 2001. – P. 261–272.
46. Giannakourou M. C., Taoukis P. S. Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions // *Food Chem.*, 2003, 83, p. 33–41.
47. Gregory J. F. Effects of ε-pyridoxyllysine bound to dietary protein on the vitamin B_6 status of rats // *J. Nutr.*, 1980, 110, p. 995–1005.
48. Gregory J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates // *Adv. Food Nutr. Res.*, 1989, 33, p. 1–101.
49. Gregory J. F. Ascorbic acid bioavailability in foods and supplements // *Nutr. Rev.*, 1993, 51, p. 301–309.
50. Gregory J. F. Chemical changes of vitamins during food processing // *Chemical Changes in Food during Processing* / T. Richardson, J. W. Finley (eds). – Westport, CT: AVI Publishing Co., 1985. – P. 373–408.
51. Gregory J. F. Methods for determination of vitamin B_6 in foods and other biological materials: a critical review // *J. Food Compost. Anal.*, 1993, 1, p. 105–123.
52. Gregory J. F. Bioavailability of thiamin // *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1997, 51, p. S34–S37.
53. Gregory J. F. Bioavailability of vitamin B_6 // *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1997, 51, p. S43–S48.
54. Gregory J. F. Bioavailability of folate // *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1997, 51, p. S54–S59.
55. Gregory J. F., Hiner M. E. Thermal stability of vitamin B_6 compounds in liquid model food systems // *J. Food Sci.*, 1983, 48, p. 1323–1327, 1339.
56. Gregory J. F., Ink S. L. Identification and quantification of pyridoxine-β-glucoside as a major form of vitamin B_6 in plant-derived foods // *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, p. 76–82.
57. Gregory J. F, Ink S. L., Sartain D. B. Degradation and binding to food proteins of vitamin B_6 compounds during thermal processing // *J. Food Sci.*, 1986, 51, p. 1345–1351.
58. Gruenwedel D. W., Patnaik R. K. Release of hydrogen sulfide and methyl mercaptan from sulfur-containing amino acids // *J. Agric. Food Chem.*, 1971, 19, p. 775–779.

59. Hamm D. J., Lund D. B. Kinetic parameters for thermal inactivation of pantothenic acid // *J. Food Sci.*, 1978, 43, p. 631–633.
60. Harris E. D. The pyrroloquinoline quinone (PQQ) coenzymes: a case of mistaken identity // *Nutr. Rev.*, 1992, 50, p. 263–274.
61. Harris R. S. General discussion on the stability of nutrients // *Nutritional Evaluation of Food Processing* / R. S. Harris, H. von Loesecke (eds). – Westport, CT: AVI Publishing Co., 1971. – P. 1–4.
62. Harris R. S., Karmas E. *Nutritional Evaluation of Food Processing.* – 2nd ed. – Westport, CT: AVI Publishing Co., 1975.
63. Harris R. S., von Loesecke H. *Nutritional Evaluation of Food Processing.* – Westport, CT: AVI Publishing Co., 1971.
64. Hassinen J. B., Durbin G. T., Bernhart F. W. The vitamin B_6 content of milk products // *J. Nutr.*, 1954, 53, p. 249–257.
65. Herbert V. Vitamin B_{12}: plant sources, requirements, and assay // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988, 48, p. 852–858.
66. Herbert V. Vitamin B_{12} // *Present Knowledge in Nutrition* / M. L. Brown (ed.); International Life Sciences Institute.– 6th ed. Washington, D.C.: Nutrition Foundation, 1990. – P. 170–178.
67. Hill M. K., Grieger-Block R. A. Kinetic data: generation, interpretation, and use // *Food Technol.*, 1980, 34, p. 56–66.
68. Holden J. M., Harnly J. M., Beecher G. R. Food composition // *Present Knowledge in Nutrition* / B. B. Bowman, R. M. Russell (eds); International Life Sciences Institute. – 8th ed. – Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. – P. 593–604.
69. Hoppner K., Lampi B. Pantothenic acid and biotin retention in cooked legumes // *J. Food Sci.*, 1993, 58, p. 1084–1085, 1089.
70. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B_6, Folate, Vitamin B_{12}, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline / Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. – Washington, D.C.: National Academy Press, 1998.
71. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids / Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. – Washington, D.C.: National Academy Press, 2000.
72. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc / Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. – Washington, D.C.: National Academy Press, 2002.
73. Jongehan J. A., Mager H. I. X., Berends W. Autoxidation of 5-alkyl-tetrahydropteridines. The oxidation product of 5-methyl-THF // *The Chemistry and Biology of Pteridines* / R. Kisliuk (ed.). – Elsevier, North Holland, Inc., 1979. – P. 241–246.
74. Kacem B., Cornell J. A., Marshall M. R., Shireman R. B., Matthews R. F. Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange juice and orange drinks. Effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen // *J. Food Sci.*, 1987, 52, p. 1668–1672.
75. Karel M. Prediction of nutrient losses and optimization of processing conditions // *Nutritional and Safety Aspects of Food Processing* / S. R. Tannenbaum (ed.). – NY: Marcell Dekker, 1979. – P. 233–263.
76. Karlin R., Hours C., Vallier C., Bertoye R., Berry N., Morand H. Sur la teneur en Mates des laits de grand melange. Effects de divers traitment thermiques sur les taux de folates, B_{12} et B_6 de ces laits // *Int. Z. Vitaminforsch.*, 1969, 39, S. 359–371.
77. Karmas E., Harris R. S. *Nutritional Evaluation of Food Processing.* – 3rd ed. – NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1988.
78. Khachik F., Beecher G. R., Lusby W. R. Separation, identification, and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grapefruit by liquid chromatography // *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, p. 1465–1473.
79. Khan M. M. T., Martell A. E. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion oxidation // *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, p. 4176–4185.
80. Khan M. M. T., Martell A. E. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. II. Cupric and ferric chelate catalyzed oxidation // *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, p. 7104–7111.
81. Kilgore J., Smidt C., Duich L., Romero-Chapman N., Tinker D., Melko M., Hyde D., Rucker R. Nutritional importance of pyrroloquinoline quinine // *Science,* 1989, 245, p. 850–852.
82. Kirk J., Dennison D., Kokoczka P., Heldman D. Degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system // *J. Food Sci.*, 1977, 42, p. 1274–1279.
83. Klein B. P., Perry A. K. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States // *J. Food Sci.*, 1982, 47, p. 941–945.
84. Konings J. M., Roomans H. H. S., Dorant E., Goldbohm R. A., Saris W. H. M., van den Brandt P. A. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods // *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, 73, p. 765–776.
85. Labuza T. P. A theoretical comparison of losses in foods under fluctuating temperature sequences // *J. Food Sci.*, 1979, 44, p. 1162–1168.
86. Labuza T. P. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration // *Food Technol.* 1980, 34, p. 36–41, 59.
87. Labuza T. P., Kamman J. F. A research note. Comparison of stability of thiamin salts at high temperature and water activity // *J. Food Sci.*, 1982, 47, p. 664–665.
88. Leichter J., Switzer V. P., Landymore A. F. Effect of cooking on folate content of vegetables // *Nutr. Rep. Int.*, 1978, 18, p. 475–479.
89. Lenz M. K., Lund D. B. Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components // *Food Technol.*, 1980, 34, p. 51–55.
90. Liao M.-L., Seib P. A. Selected reactions of L-ascorbic acid related to foods // *Food Technol.*, 1987, 41, p. 104–107, 111.

91. Lund D. B. Designing thermal processes for maximizing nutrient retention // *Food Technol.*, 1977, 31, p. 71–78.
92. Lund D. Effect of commercial processing on nutrients // *Food Technol.*, 1979, 33, p. 28–34.
93. Lund D. Effects of heat processing on nutrients // *Nutritional Evaluation of Food Processing* / E. Karmas, R. S. Harris (eds). 3rd ed. – NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1988. – P. 319–354.
94. Machlin L. J. Vitamin E // *Handbook of Vitamins.* – 2nd ed., rev. and exp. – NY: Marcell Dekker, Inc., 1991. – P. 99–144.
95. Malewski W., Markakis P. A research note. Ascorbic acid content of developing tomato fruit // *J. Food Sci.*, 1971, 36, p. 537.
96. Mangels A. R., Block G., Frey C. M. et al. The bioavailability to humans of ascorbic acid from oranges, orange juice and cooked broccoli is similar to that of synthetic ascorbic acid // *J. Nutr.*, 1993, 123, p. 1054–1061.
97. Maruyama T., Shiota T., Kramdieck C. L. The oxidative cleavage of folates. A critical study // *Anal. Biochem.*, 1978, 84, p. 277–295.
98. Mauri L. M., Alzamora S. M., Chirife J., Tomio M. J. Review: kinetic parameters for thiamine degradation in foods and model solutions of high water activity // *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1989, 24, p. 1–9.
99. Misir R., Blair R. Biotin bioavailability of protein supplements and cereal grains for starting turkey poults // *Poult. Sci.*, 1988, 67, p. 1274–1280.
100. Mnkeni A. P., Beveridge T. Thermal destruction of 5-methyltetrahydrofolic acid in buffer and model food systems // *J. Food Sci.*, 1983, 48, p. 595–599.
101. Mock D. M., Mock N. I., Langbehn S. E. Biotin in human milk: methods, location, and chemical form // *J. Nutr.*, 1992, 122, p. 535–545.
102. Moran R. Nutritional significance of recent work on wheat flour and bread // *Nutr. Abstr. Rev.*, 1959, 29, p. 1–10.
103. Mozafar A., Oertli J. J. Uptake of a microbially-produced vitamin (B_{12}) by soybean roots // *Plant Soil*, 1992, 139, p. 23–30.
104. Mulley E. A., Strumbo C. R., Hunting W. M. Kinetics of thiamine degradation by heat. Effect of pH and form of the vitamin on its rate of destruction // *J. Food Sci.*, 1975, 40, p. 989–992.
105. Nagy S. Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review // *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28, p. 8–18.
106. Navankasattusas S., Lund D. B. Thermal destruction of vitamin B_6 vitamers in buffer solution and cauliflower puree // *J. Food Sci.*, 1982, 47, p. 1512–1518.
107. Park Y. K., Sempos C. T., Barton C. N., Vanderveen J. E., Yetley E. A. Effectiveness of food fortification in the United States: the case of pellagra // *Am. J. Public Health*, 2000, 90, p. 727–738.
108. Pelletier O. Vitamin C // *Methods of Vitamin Assay* / J. Augustin, B. P. Klein, D. A. Becker, P. B. Venugopal (eds). – 4th ed. – NY: John Wiley & Sons, 1985. – P. 303–347.
109. Pesek C. A. Warthesen J. J. Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of β-carotenes // *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, p. 1313–1315.
110. Pfeiffer C. M., Rogers L. M., Gregory J. F. Determination of folate in cereal-grain food products using tri-enzyme extraction and combined affinity and reverse-phase liquid chromatography // *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, p. 407–413.
111. Pfeiffer C. M., Rogers L. M., Bailey L. B., Gregory J. F. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined using a dual-label stable-isotope protocol // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 66, p. 1388–1397.
112. Poe M. Acidic dissociation constants of folic acid, dihydrofolic acid, and methotrexate // *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, p. 3724–3728.
113. Porzio M. A., Tang N., Hilker D. M. Thiamine modifying properties of heme proteins from skipjack tuna, pork, and beef // *J. Agric. Food Chem.* 1973, 21, p. 308–310.
114. Prior W. A.Vitamin E // *Present Knowledge in Nutrition.* – 8th ed. – B. B. Bowman, R. M. Russell (eds); International Life Sciences Institute. – Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. – P. 156–163.
115. Reed L. S., Archer M. C. Oxidation of tetrahydrofolic acid by air // *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28, p. 801–805.
116. Reiber H. Photochemical reactions of vitamin B_6 compounds, isolation and properties of products // *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 279, p. 310–315.
117. Rivlin R. S. Riboflavin // *Present Knowledge in Nutrition.* – 8th ed. – B. B. Bowman, R. M. Russell (eds); International Life Sciences Institute. – Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. – P. 191–198.
118. Rizvi S. S. H., Acton J. C. Nutrient enhancement of thermostabilized foods in retort pouches // *Food Technol.*, 1982, 36, p. 105–109.
119. Robinson D. R. The nonenzymatic hydrolysis of N5,N10-methenyltetrahydrofolic acid and related reactions // *Methods in Enzymology* / F. Chytyl (ed.). – Vol. 18B. – San Diego, CA: Academic Press, 1971. – P. 716–725.
120. Roughead Z. K., McCormick D. B. Qualitative and quantitative assessment of flavins in cow's milk // *J. Nutr.*, 1990, 120, p. 382–388.
121. Roughead Z. K., McCormick D. B. Flavin composition of human milk // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1990, 52, p. 854–857.
122. Russell R. M., Baik H., Kehayias J. J. Older men and women efficiently absorb vitamin B_{12} from milk and fortified bread // *J. Nutr.*, 2001, 131, p. 291–293.
123. Ryley J., Kajda P. Vitamins in thermal processing // *Food Chem.*, 1994, 49, p. 119–129.

124. Saidi B., Warthesen J. J. Influence of pH and light on the kinetics of vitamin B_6 degradation // *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31, p. 876–880.
125. Sauberlich H. E., Kretsch M. J., Skala J. H., Johnson H. L., Taylor P. C. Folate requirements and metabolism in nonpregnant women // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1987, 46, p. 1016–1028.
126. Sauer W. C., Mosenthin R., Ozimek L. The digestibility of biotin in protein supplements and cereal grains for growing pigs // *J. Anim. Sci.*, 1988, 66, p. 2583–2589.
127. Scarpa M., Stevanato R., Viglino P., Rigo A. Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen // *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, p. 6695–6697.
128. Selman J. D. Vitamin retention during blanching of vegetables // *Food Chem.*, 1993, 49, p. 137–147.
129. Seyoum E., Selhub J. Combined affinity and ion pair column chromatographies for the analysis of food folate // *J. Nutr. Biochem.*, 1993, 4, p. 488–494.
130. Shah J. J. Riboflavin // *Methods of Vitamin Assay* / J. Augustin, B. P. Klein, D. A. Becker, P. B. Venugopal (eds.). – 4th edn. – NY: John Wiley & Sons, 1985. – P. 365–383.
131. Shaw S., Jayatilleke E., Herbert V., Colman N. Cleavage of folates during ethanol metabolism // *Biochem. J.* 1989, 257, p. 277–280.
132. Shintani D., DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering // *Science,* 1998, 282, p. 2098–2100.
133. Sies H., Stahl W., Sundquist A. R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids // *Beyond Deficiency. New Views on the Functions and Health Effects of Vitamins* / H. E. Sauberlich, L. J. Machlin (eds.); N. Y. Academy of Science // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992, 669. p. 7–20.
134. Snell E. E. Vitamin B_6 // *Compr. Biochem.*, 1963, 2, p. 48–58.
135. Srncova V., Davidek J. Reaction of pyridoxal and pyridoxal-5-phosphate with proteins. Reaction of pyridoxal with milk serum proteins // *J. Food Sci.*, 1972, 37, p. 310–312.
136. Stabler S. P. Vitamin B_{12} // *Present Knowledge in Nutrition* / B. B. Bowman, R. M. Russell (eds); International Life Sciences Institute. – 8th ed. – Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. – P. 230–240.
137. Steele C. J. Cereal fortification – technological problems // *Cereal Foods World,* 1976, 21, p. 538–540.
138. Tadera K., Arima M., Yagi F. Participation of hydroxyl radical in hydroxylation of pyridoxine by ascorbic acid // *Agric. Biol. Chem.*, 1988, 52, p. 2359–2360.
139. Taher M. M., Lakshmaiah N. Hydroperoxide-dependent folk acid degradation by cytochrome c // *J. Inorg. Biochem.*, 1987, 28, p. 133–141.
140. Tannenbaum S. R. Young V. R., Archer M. C. Vitamins and minerals // *Food Chemistry* / O. R. Fennema (ed.). – 2nd ed., rev. and exp. – NY: Marcell Dekker, 1985. – P. 477–544.
141. Tarr J. B., Tamura T., Stokstad E. L. R. Availability of vitamin B_6 and pantothenate in an average American diet in man // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1981, 34, p. 1328–1337.
142. Teixeira A. A., Dixon J. R., Zahradnik J. W., Zinsmeister G. E. Computer optimization of nutrient retention in the thermal processing of conduction-heating foods // *Food Technol.*, 1969, 23, p. 845.
143. Thompson J. N. Problems of official methods and new techniques for analysis of foods and feeds for vitamin A // *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 1986, 69, p. 727–738.
144. Thompson J. N., Hatina G. Determination of tocopherols and tocotrienols in foods and tissues by high performance liquid chromatography // *J. Liq. Chromatogr.*, 1979, 2, p. 327–344.
145. Tsukida K., Saiki K., Sugiura M. Structural elucidation of the main cis-β-carotenes // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1981, 27, p. 551–556.
146. Vanderslice J. T., Higgs D. J. Chromatographic separation of ascorbic acid, isoascorbic acid, dehydroascorbic acid and dehydroisoascorbic acid and their quantitation in food products // *J. Micronutr. Anal.*, 1988, 4, p. 109–118.
147. Van Niekerk P. J. Determination of vitamins // *HPLC in Food Analysis* / R. Macrae (ed.). – 2nd ed. – San Diego: Academic Press, 1988. – P. 133–184.
148. Van Niekerk P. J., Burger A. E. C. The estimation of the composition of edible oil mixtures // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1985, 62, p. 531–538.
149. Viberg U., Jagerstad M., Oste R., Sjoholm I. Thermal processing of 5-methyltetrahydrofolic acid in the UHT region in the presence of oxygen // *Food Chem.* 1997, 59, p. 381–386.
150. Wall J. S., Carpenter K. J. Variation in availability of niacin in grain products. Changes in chemical composition during grain development and processing affect the nutritional availability of niacin // *Food Technol.*, 1988, 42, p. 198–204.
151. Wall J. S., Young M. R., Carpenter K. S. Transformation of niacin-containing compounds in corn during grain development. Relationship to niacin nutritional availability // *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, p. 752–758.
152. Weiser H., Vecchi M. Stereoisomers of α-tocopheryl acetate. II. Biopotencies of all eight stereoisomers, individually or in mixtures, as determined by rat resorption-gestation tests // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1982, 32, p. 351–370.
153. Wendt G., Bernhart F. W. The structure of a sulfur-containing compound with vitamin B_6 activity // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, 88, p. 270–272.

154. Wiesinger H., Hinz H.-J. Kinetic and thermodynamic parameters for Schiff base formation of vitamin B_6 derivatives with amino acids // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1984, 235, p. 34–40.

155. Woodcock E. A., Warthesen J. J., Labuza T. P. Riboflavin photochemical degradation in pasta measured by high performance liquid chromatography // *J. Food Sci.*, 1982, 47, p. 545–555.

156. Wyse B. W, Song W. O., Walsh J. H., Hansen R. G. Pantothenic acid // *Methods of Vitamin Assay* / J. Augustin, B. P. Klein, D. A. Becker, P. B. Venugopal (eds). – 4th ed. – NY: John Wiley & Sons, 1991. – P. 399–416.

157. Yasumoto K., Tsuji H., Iwami K., Mitsuda H. Isolation from rice bran of a bound form of vitamin B6 and its identification as 5'-O-(β-D-glucopyranosyl)pyridoxine // *Agric. Biol. Chem.*, 1977, 41, p. 1061–1067.

158. Zechmeister L. Stereoisomeric provitamins A // *Vitam. Hormones (N. Y.)*, 1949, 7, p. 57–81.

159. Zeisel S. H., Mar M. H., Howe J. C., Holden J. M. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods // *J. Nutr.*, 2003, 133, p. 1302–1307.

160. Zempleni J. Biotin // *Present Knowledge in Nutrition* / B. B. Bowman, R. M. Russell (eds); International Life Sciences Institute. – 8th ed. – Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. – P. 241–252.

161. Zoltevicz J. A., Kauffman G. M. Kinetics and mechanism of the cleavage of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamin, and a derivative by bisulfite ion in aqueous solution. Evidence for an intermediate // *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, p. 3134–3142.

Дополнительная литература

Augustin J., Klein B. P., Becker D. A., P. B. Venugopal (eds.). *Methods of Vitamin Assay.* – 4th ed. – NY: John Wiley & Sons, 1985.

Bauernfeind J. C., Lachance P. A. Nutrient Additions to Food. Nutritional, Technological and Regulatory Aspects. – Food and Nutrition Press, Inc., 1992.

Trambull C. T. Brody T. *Nutritional Biochemistry.* – Orlando, FL: Academic Press, 1994.

Bowman B. B., Russell R. M (ed.). *Present Knowledge in Nutrition* / International Life Sciences Institute. – 8th ed. – Washington, DC: ILSI Press, 2001.

Chytyl F., McCormick D. B. (eds). *Methods in Enzymology.* – Vol. 122, 123, Parts G, H (respectively). Vitamins and Coenzymes. San Diego, CA: Academic Press, 1986.

Davidek, J., Velisek J., Polorny J. (eds). Vitamins. – *Chemical Changes during Food Processing.* – Ch. 4. – Amsterdam :Elsevier, 1990. – P. 230–301.

Eitenmiller R. R., Landen, W. O., Jr. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences.* – Weimar, TX: Culinary and Hospitality Industry Publications Services, 1998.

Harris R. S., Karmas E. *Nutritional Evaluation of Food Processing.* – 2nd ed. – Westport, CT: AVI Publishing Co., 1975.

Harris R. S., von Loesecke H. *Nutritional Evaluation of Food Processing.* – Westport, CT: AVI Publishing Co., 1971.

Nutrition Labeling. Issues and Directions for the 1990s / D. V. Porter, R. O. Earl (eds.); Institute of Medicine. – Washington, DC: National Academy Press, 1990.

Karmas E., Harris R. S. *Nutritional Evaluation of Food Processing.* – 3rd ed. – NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1988.

McCormick D. B. Coenzymes, Biochemistry // *Encyclopedia of Human Biology.* – Vol. 2. – San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1991. – P. 527–545.

McCormick D. B., Suttie J. W., Wagner C. *Methods in Enzymology.* – Vol. 280, 281, Parts K and J (respectively), Vitamins and Coenzymes. – San Diego, CA Academic Press, 1997.

Rucker R. B., Suttie J. W., McCormick D. B., Machlin L. J. (eds). *Handbook of Vitamins.* – 3rd ed. – Weimar, TX: Culinary and Hospitality Industry Publications Services, 2001.

8. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Деннис Д. Миллер (*Dennis D. Miller*)
Перевод д-ра хим. наук С. В. Макарова под науч. ред. д-ра техн. наук, проф. Л. Н. Шатнюк

Содержание

8.1. Введение. 486
8.2. Основные принципы химии минеральных веществ . 487
8.2.1. Растворимость минеральных веществ в воде . 487
8.2.2. Минеральные вещества и химия кислот и оснований. . 487
8.2.2.1. Теория кислот и оснований Бренстеда 487
8.2.2.2. Теория кислот и оснований Льюиса 488
8.2.3. Хелаты . 489
8.3. Минеральные вещества в питании . 491
8.3.1. Эссенциальные минеральные элементы 491
8.3.2. Рекомендации (США и Канада) по потреблению минеральных компонентов пищи 491
8.3.3. Усвояемость минеральных элементов . . 494
8.3.3.1. Факторы повышения биоусвояемости 495
8.3.3.2. Факторы снижения биоусвояемости. . . 497
8.3.4. Эссенциальные минеральные вещества в питании. Общие сведения 498
8.3.5. Отдельные минеральные вещества в питании . 499
8.3.5.1. Кальций 500
8.3.5.2. Фосфор. 501
8.3.5.3. Натрий, калий и хлор. 501
8.3.5.4. Железо 502
8.3.5.5. Цинк 504
8.3.5.6. Йод 505
8.3.5.7. Селен . . . 505
8.3.6. Токсикология тяжелых металлов, присутствующих в пище. . . 507
8.3.6.1. Свинец . 507
8.3.6.2. Ртуть 508
8.3.6.3. Кадмий 509
8.4. Минеральный состав пищевых продуктов. 510
8.4.1. Зола. Определение и значение зольности в анализе пищевых продуктов 510
8.4.2. Отдельные минеральные вещества . . . 510
8.4.3. Факторы, влияющие на минеральный состав пищевых продуктов 510
8.4.3.1. Факторы, влияющие на минеральный состав пищевых продуктов растительного происхождения. 512
8.4.3.2. Значение растительной пищи для удовлетворения потребности человека в минеральных веществах . . . 512
8.4.3.3. Факторы, влияющие на минеральный состав пищевых продуктов животного происхождения . . 514
8.4.3.4. Значение животной пищи для удовлетворения потребности человека в минеральных веществах . . . 514
8.4.4. Обогащение пищевых продуктов минеральными веществами . 515
8.4.4.1. Железо 515

8.4.4.2. Цинк . . 517
8.4.4.3. Йод . 518
8.4.5. Технологические аспекты . 518
8.5. Химические и функциональные свойства минеральных веществ в пищевых продуктах . 519
8.5.1. Кальций 521
8.5.2. Фосфаты 521
8.5.3. Хлорид натрия . 521
8.5.4. Железо . . 522
8.5.5. Никель . . 523
8.5.6. Медь 523
8.6. Заключение 523
Литература . 523

8.1. Введение

В земной коре содержится 90 химических элементов. Около двадцати пяти из них относятся к эссенциальным веществам, поэтому они присутствуют в живых клетках (рис. 8.1). Поскольку источниками пищи для человека являются растения или животные, эти элементы также присутствуют и в пище. Пищевые продукты содержат и другие элементы, поскольку живые системы могут аккумулировать их из окружающей среды вместе с эссенциальными. Кроме того, различные элементы могут попадать в пищу в процессе уборки урожая, приготовления и хранения продуктов, а также содержаться в биологически активных добавках к пище.

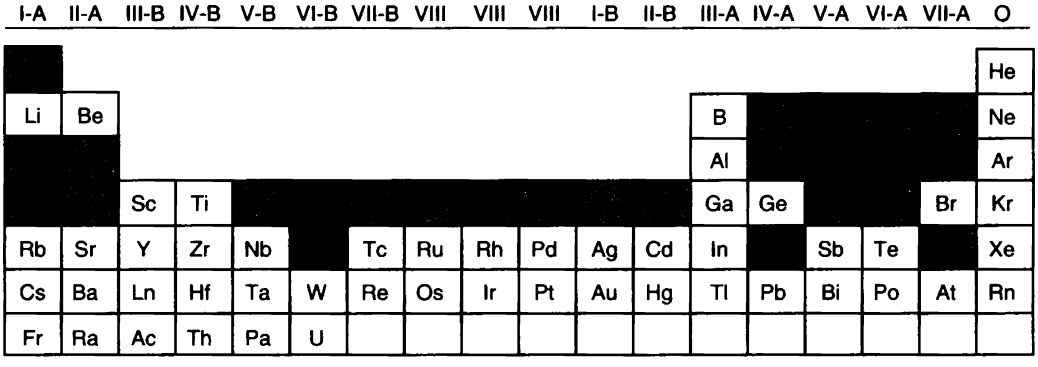


Рис. 8.1. Периодическая система элементов. Темным цветом обозначены элементы, которые считаются эссенциальными нутриентами для животных и человека

Хотя общепринятого определения понятия «минеральный» применительно к пище и питанию нет, обычно этот термин объединяет все элементы, присутствующие в пище, кроме углерода C, водорода H, кислорода O и азота N. Указанные четыре «неминеральных» элемента входят преимущественно в состав органических молекул и воды и составляют около 90% от общего числа атомов, составляющих живые системы [24]. Таким образом, минеральные элементы содержатся в пище в относительно низких концентрациях, но несмотря на это они играют ключевую роль как в живых системах, так и в пищевых продуктах.

Исторически сложившаяся классификация разделяет все минеральные соединения в зависимости от их концентраций в клетках растений и животных на основные (макро-) и следовые (микро-). Эта классификация сложилась тогда, когда аналитические методы не давали возможности точно определить малые концентрации элементов. Поэтому термин «следовые количества» использовался для обозначения присут-

ствия элемента в концентрациях, точное значение которых определить было невозможно. Современные аналитические методы позволяют определить точное содержание практически всех элементов периодической таблицы [75]. Тем не менее, термины «основные» и «следовые» («минорные») элементы продолжают использоваться при описании роли неорганических веществ в биологических системах. К основным макроэлементам относят кальций, фосфор, магний, натрий, калий и хлор, а к микроэлементам — железо, йод, цинк, селен, хром, медь, фтор и олово.

8.2. Основные принципы химии минеральных веществ

Минеральные элементы присутствуют в пище в различных химических формах. Эти формы (соединения, комплексы, свободные ионы) обычно объединяют термином *вещества* [109]. Если учесть разнообразие химических свойств элементов, число и разнообразие неминеральных соединений в пище, которые могут связывать неорганические элементы, и химические изменения, происходящие в процессе производства пищевых продуктов и их хранения, то легко себе представить, насколько огромно количество неорганических веществ в пище. Поскольку состав пищевых продуктов очень сложен, а многие неорганические вещества весьма нестойки, их зачастую очень трудно выделять и описывать. В связи с этим наши знания о состоянии неорганических веществ в пище довольно ограничены. Помочь предсказать поведение этих веществ нам помогут основные принципы и концепции неорганической, органической и биохимии, изложенные в учебной и научной литературе.

8.2.1. Растворимость минеральных веществ в воде

Большинство нутриентов поступает в организм и метаболизируются им, будучи растворенными в воде. Поэтому во многом их концентрация и реакционная способность зависят от растворимости в воде. Так как почти все химические элементы как таковые (исключение составляют дикислород и азот) нерастворимы в воде, они не обладают физиологической активностью в живых системах.

Форма, в которой присутствует тот или иной элемент в пище, зависит прежде всего от химических свойств этого элемента. Элементы групп I-A и VII-A (рис. 8.1 и 8.2) находятся в пище преимущественно в виде свободных ионов (Na^+, K^+, Cl^- и F^-). Катионы натрия и калия не склонны к образованию комплексных соединений, их соединения очень хорошо растворимы в воде. Таким образом, в водных растворах эти элементы существуют в основном в виде свободных ионов. Большая часть других элементов образуют в водных растворах слабые комплексы, хелаты, или кислородсодержащие анионы (см. ниже).

Растворимость неорганических комплексов и хелатов может очень сильно отличаться от растворимости неорганических солей. Так, если хлорид трехвалентного железа растворить в воде, будет наблюдаться образование осадка $Fe(OH)_3$. С другой стороны, хелат, образованный ионом железа и цитратом, хорошо растворим в воде. Наоборот, $CaCl_2$ очень хорошо растворим в воде, а хелатный комплекс кальция с оксалатом практически нерастворим.

8.2.2. Минеральные вещества и химия кислот и оснований

Многое в химии минеральных элементов можно объяснить, если использовать концепции химии кислот и оснований. Кроме того, кислоты и основания в значительной степени влияют на свойства компонентов пищи, изменяя pH, и поэтому химия кислот и оснований чрезвычайно важна для науки о пище. Ниже приведены краткие сведения из теории кислот и оснований. Более детальную информацию можно найти в работе [100] и других учебниках по неорганической химии.

8.2.2.1. Теория кислот и оснований Бренстеда

В начале приведем основные определения. Кислота по Бренстеду — это любое соединение, способное отдавать протон. Основание по Бренстеду — это любое соединение, способное принимать протон.

Многие кислоты и основания содержатся в пище и поэтому могут использоваться при переработке пищевых продуктов как пищевые добавки и вспомогательные вещества. Из органических пищевых кислот наиболее известны уксусная, молочная и лимонная, из неорганических — фосфорная, которая использу-

ется в качестве подкислителя и вкусоароматической добавки в газированных напитках. Фосфорная кислота является трехосновной (содержит три протона):

$$H_3PO_4 \Leftrightarrow H_2PO_4^- + H^+ \qquad pK_1 = 2{,}12;$$

$$H_2PO_4^- \Leftrightarrow HPO_4^{2-} + H^+ \qquad pK_2 = 7{,}1;$$

$$HPO_4^{2-} \Leftrightarrow PO_4^{3-} + H^+ \qquad pK_3 = 12{,}4.$$

Другими важными неорганическими кислотами являются соляная (HCl) и серная (H_2SO_4). Непосредственно в пищевых продуктах они не используются, но могут образовываться при их переработке, а также при приготовлении пищи. Например, серная кислота образуется при нагревании широко используемого кислого натрий-алюминий сульфата в присутствии воды:

$$Na_2SO_4\ Al_2(SO_4)_3 + 6\,H_2O \rightarrow Na_2SO_4 + 2\,Al(OH)_3 + 3\,H_2SO_4$$

8.2.2.2. Теория кислот и оснований Льюиса

Более общая теория была разработана Дж. Н. Льюисом в 1930-х гг. [100]. По Льюису, кислота и основание — это соответственно акцептор и донор электронной пары. Льюисовские кислоты принято обозначать буквой «А», а основания — буквой «В». Реакцию между ними можно представить следующим образом:

$$A + :B \rightarrow A - B$$

Важно помнить, что в ходе данной реакции не меняется окислительное состояние А и В, то есть это не окислительно-восстановительная реакция. Кислота А должна иметь свободную низкоэнергетическую орбиталь, а основание В — неподеленную пару электронов. В результате взаимодействия А и В образуются новые молекулярные орбитали. Стабильность возникшего комплекса обусловливается прежде всего понижением энергии электронов вследствие образования связывающих молекулярных орбиталей. Электронная структура таких комплексов весьма сложна, так как вклад в нее вносят многочисленные атомные орбитали. Например, в формировании молекулярных орбиталей соединений *d*-металлов могут участвовать до девяти атомных орбиталей этих элементов (1*s*, 3*p* и 5*d*). Продукт реакции льюисовской кислоты и основания является комплексом, в котором связь образуется за счет пары электронов от донора :В.

Концепция Льюиса очень важна для понимания химии минеральных веществ пищевых продуктов, так как катионы металлов являются льюисовскими кислотами, которые могут взаимодействовать с основаниями Льюиса. В результате этих реакций образуются разные соединения: гидроксиды металлов, металлосодержащие пигменты (в частности гемоглобин и хлорофилл), а также металлоферменты.

Число молекул оснований Льюиса, которые могут связываться одним ионом металла, слабо зависит от его заряда. Это число, называемое координационным, изменяется от 1 до 12, но чаще всего оно равно 6. Например, ион Fe^{3+} связывает шесть молекул воды, образуя гексааквакомплекс железо, имеющее октаэдрическое строение (рис. 8.2).

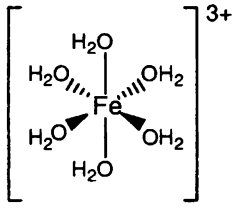


Рис. 8.2. Ион железа Fe^{3+} связан с шестью молекулами воды. Это преобладающая форма железа Fe^{3+} в кислых (pH < 1) водных растворах

Доноры электронов в подобных комплексах называются *лигандами*. Важнейшими атомами-донорами электронов в молекулах лигандов являются атомы кислорода, азота и серы. Таким образом, многие молекулы нутриентов, включая белки, углеводы, фосфолипиды, органические кислоты, играют в комплексах с минеральными ионами роль лигандов.

В зависимости от числа связей, образуемых лигандами с ионом металла, они могут быть поделены на монодентатные (образующие одну связь), бидентатные (образующие две связи) и т. д. Лиганды, образующие две и более связи, называются мультидентатными. Примеры лигандов приведены на рис. 8.3.

Стабильность металлокомплексов характеризуют константы равновесия реакции их образования. В неорганической химии в равной мере используют термины «константа устойчивости» (*k*) и «константа образования». В общем

виде реакцию образования комплекса металла (M) и лиганда (L) можно записать следующим образом [100]:

$$M + L \rightleftarrows ML \qquad k_1 = \frac{[ML]}{[M[[L]}$$

$$ML + L \rightleftarrows ML_2 \qquad k_2 = \frac{[ML_2]}{[ML[[L]}$$

$$\downarrow\downarrow \qquad\qquad \downarrow$$

$$\downarrow\downarrow \qquad\qquad \downarrow$$

$$ML_{n-1} + L \rightleftarrows ML_n \qquad k_n + \frac{[ML_n]}{[ML_{n-1}[[L]}$$

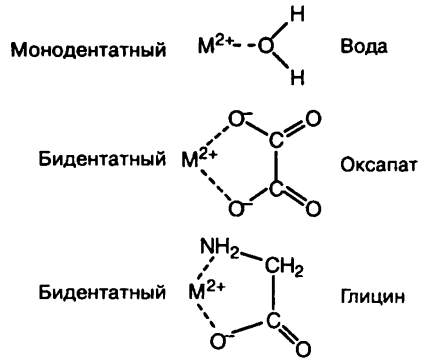


Рис. 8.3. Примеры лигандов, образующих комплексы с ионом металла (M^+)

Если в реакции с ионом металла участвуют больше одного лиганда, выражение для суммарной константы записывают следующим образом:

$$K = \frac{[ML_n]}{[M[[L]^n}$$

где $K = \beta_n = k_1 k_2 ... k_n$, а n — число лигандов, приходящееся на один атом металла. Значения констант устойчивости некоторых комплексов приведены в табл. 8.1.

Таблица 8.1

Константы устойчивости (log$K$) некоторых комплексов и хелатов металлов. По [100]

Лиганд	Cu^{2+}	Fe^{3+}
OH^-	6,3	11,8
Оксалат	4,8	4,8
Гистидин	10,3	10,0
ЭДТА	18,7	25,1

Примечание. Значения log K определены при одинаковой ионной силе раствора.

8.2.3. Хелаты

Хелатом называется комплекс, включающий ион металла и мультидентатный лиганд, причем лиганд образует две или более связи с металлом так, что возникает кольцо с участием этого иона. Название «хелат» происходит от греческого слова «хеле» (клешня). Хелатный лиганд (называемый также хелатным агентом) должен содержать по меньшей мере два электронодонорных фрагмента. Кроме того, эти фрагменты (функциональные группы) должны располагаться так, чтобы сформировать кольцо, включающее ион металла. Термодинамически хелаты более стабильны, чем подобные им нехелатные комплексы, благодаря так называемому «хелатному эффекту». По мнению авторов работы [59], стабильность хелатов зависит от ряда факторов, в том числе:

1) размера кольца — пятичленные ненасыщенные и шестичленные насыщенные циклы более стабильны, чем циклы с меньшим или большим числом членов;
2) числа колец (циклов) — чем их больше в хелате, тем более он устойчив;
3) силы кислоты Льюиса — чем она больше, тем более устойчив хелат.
4) заряда лиганда — лиганды, имеющие заряд, образуют более устойчивые хелаты по сравнению с незаряженными; например, хелаты, включающие цитрат, более устойчивы, чем имеющие в своем составе лимонную кислоту.
5) окружения атома-донора — представленные ниже ряды показывают зависимость прочности связи металл-лиганд в зависимости от строения лиганда:
   - атом-донор — кислород: $H_2O > ROH > R_2O$,

атом-донор — азот: $H_3N > RNH_2 > R_3N$,
атом-донор — сера: $R_2S > RSH > H_2S$;

6) резонанса в хелатном цикле — повышенный резонанс увеличивает устойчивость цикла;
7) стерических помех — объемные лиганды с большим числом заместителей образуют менее устойчивые хелаты.

Таким образом, стабильность хелатов зависит от множества факторов, поэтому ее довольно трудно предсказать. Очень важной характеристикой, позволяющей оценить стабильность комплексов, является свободная энергия Гиббса ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Рассмотрим ее использование на примере комплексов Cu^{2+} с аммиаком и этилендиамином [100].

$$Cu(H_2O)^{2+}_6 + 2NH_3 \rightarrow [Cu(H_2O)_4(NH_3)_2]^{2+} + 2H_2O$$

($\Delta H = -46$ кДж/моль; $\Delta S = -0{,}4$ Дж/моль·К; lg K = 7,7)

$$Cu(H_2O)_6^{2+} + NH_2CH_2CH_2NH_2 \rightarrow [Cu(H_2O)_4(NH_2CH_2CH_2NH_2)]^{2+} + 2H_2O$$

($\Delta H = -54$ кДж/моль; $\Delta S = +23$ Дж/моль·К; lg K = 10,1)

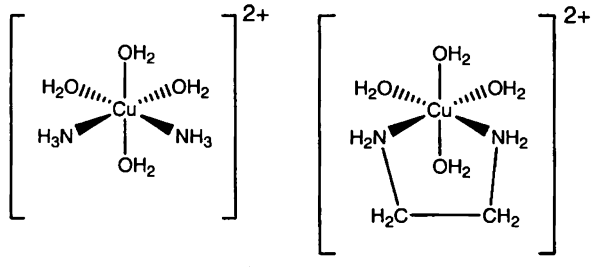
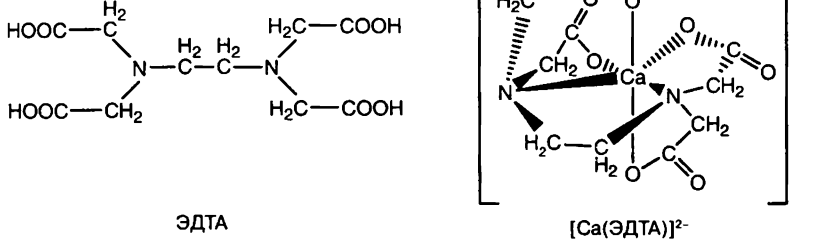


Рис. 8.4. Комплексы Cu^{2+} с аммиаком и этилендиамином

В обоих комплексах два атома азота связаны с ионом меди (рис. 8.4), тем не менее комплекс с этилендиамином значительно стабильнее аммиачного комплекса (значения логарифмов констант образования равны соответственно 10,1 и 7,7). Оба члена — энтальпийный и энтропийный — вносят свой вклад в энергию Гиббса, однако для хелатного эффекта наиболее важно изменение энтропии. Будучи монодентатным лигандом, аммиак образует одну связь с ионом меди, в то время как бидентатный лиганд этилендиамин — две. Изменение энтропии обусловлено изменением числа свободных молекул в растворе. В случае реакции с участием аммиака число исходных и образующихся молекул одинаково, поэтому изменение энтропии мало. Образование же комплекса с этилендиамином приводит к росту числа молекул и, следовательно, увеличению энтропии.

Еще более убедительной иллюстрацией проявления хелатного эффекта являются комплексы металлов с гексадентатным лигандом этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). При формировании комплекса в водном растворе ЭДТА замещает шесть молекул воды, что сопровождается очень большим ростом энтропии (рис. 8.5): $Ca(H_2O)_6^{2+} + ЭДТА^{4-} \rightarrow Ca(ЭДТА)^{2-} + 6H_2O$ ($\Delta S = +118$ Дж/К/моль).

Кроме того, ЭДТА-комплексы содержат пять колец (циклов), что также повышает их стабильность. Указанные особенности обусловливают высокую устойчивость комплексов ЭДТА со многими металлами.



ЭДТА [Ca(ЭДТА)]$^{2-}$

Рис. 8.5. Хелаты ЭДТА и $[Ca(ЭДТА)]^{2-}$ Показано, что в хелате карбоксильные группы ионизированы, следовательно, комплекс $[Ca(ЭДТА)]^{2-}$ имеет заряд 2^-

Хелаты чрезвычайно важны для пищевых и всех биологических систем. Добавки хелатных агентов связывают ионы металлов, в частности меди и железа, и предотвращают их прооксидантное действие. Этилендиаминтетраацетат железа может выполнять в пищевых продуктах роль обогащающего агента [10]. Кроме того, сами по себе комплексы, возникающие при взаимодействии ионов металлов с молекулами нутриентов, являются хелатами.

8.3. Минеральные вещества в питании

8.3.1. Эссенциальные минеральные элементы

Существует несколько определений эссенциального (необходимого) минерального элемента. Наиболее употребительным является следующее: «Элемент является эссенциальным для жизни, если его отсутствие в рационе или в другом пути поступления веществ в организм приводит к устойчивому и воспроизводимому ослаблению физиологической функции» [106]. Эссенциальность (необходимость) можно доказать, если будет наблюдаться ослабление физиологической функции при понижении содержания какого-либо элемента в рационе человека или подопытных животных.

Потребности человека в эсенциальных минеральных элементах варьируют в пределах от нескольких микрограммов до почти одного грамма в день. Недостаточное потребление этих элементов в течение определенного периода времени приводит к развитию их дефицита. И наоборот, избыточно высокое потребление может вызвать токсикоз. К счастью, интервал безопасного и достаточного потребления большинства минеральных элементов широк, так что их дефицит или токсичность проявляются довольно редко.

Указанный широкий интервал достаточного и безопасного потребления возможен потому, что организм располагает гомеостатическими механизмами, позволяющими ему приспосабливаться как к низкому, так и высокому поступлению эссенциальных нутриентов. Гомеостаз представляет собой процесс, с помощью которого организм поддерживает концентрацию нутриентов в тканях в узких и постоянных пределах. У высших организмов гомеостаз — это сложный комплекс процессов, включающих регуляцию всасывания, экскреции, метаболизма и хранения нутриентов. Если бы гомеостатические механизмы отсутствовали, потребление тех или иных нутриентов с пищевыми продуктами нужно было бы очень строго контролировать во избежание их дефицита или токсикоза (рис. 8.6) [71]). Тем не менее, гомеостаз может быть нарушен, если очень низкое или очень высокое потребление минеральных элементов будет продолжаться в течение длительного времени. Постоянно низкое потребление минеральных элементов часто встречается в популяциях, у которых доступ к пище ограничен. Токсические эффекты, обусловленные потреблением больших количеств минеральных элементов, встречаются реже, хотя большие концентрации натрия, по-видимому, являются главной причиной гипертонии [70].

Минеральные элементы участвуют в сотнях ферментативных реакций, играют ключевую роль в регулировании метаболизма, формировании прочных костей и зубов, при переносе кислорода и диоксида углерода кровью, а также необходимы для клеточной адгезии и при делении клеток. Они могут быть токсичными — известно много примеров отравлений и даже смертей, вызванных минеральными веществами. Основные пищевые и токсикологические характеристики минеральных элементов приведены в табл. 8.2.

8.3.2. Рекомендации (США и Канада) по потреблению минеральных компонентов пищи

В 1997 г. постоянно действующий Комитет по научной оценке рекомендуемых суточных норм потребления (РНП) при Институте Медицины подготовил доклад, в котором описан новый подход к введению норм потребления нутриентов здоровыми людьми в США и Канаде [103].

Эти новые рекомендации по нормам потребления называются Рекомендуемыми суточными нормами потребления (РНП) (*DRI, Dietary Reference Intakes*). Они заменили старые нормы потребления (*RDA*), которые впервые появились в 1941 г. и с тех пор периодически пересматривались. Последняя версия *RDA* была опубликована в 1989 г. *DRI* включают набор значений: оценочная средняя потребность (*EAR*), *RDA*, адекватный уровень потребления (*AI*), верхний

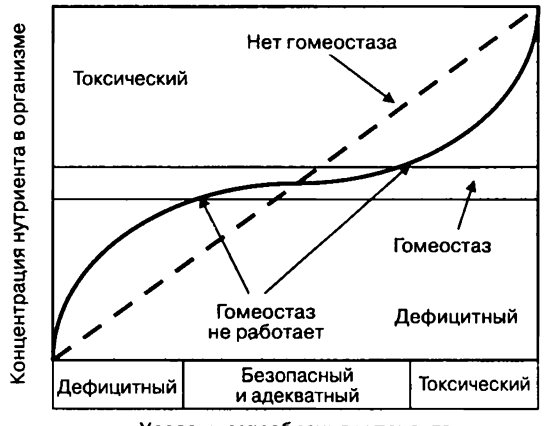


Рис. 8.6. Гомеостаз в живых организмах. В отсутствие гомеостаза (пунктирная линия) диапазон безопасных и адекватных концентраций нутриентов должен быть очень узким. При гомеостазе (сплошная линия) диапазон безопасных и адекватных нутриентов гораздо шире. По [71]

Таблица 8.2
Пищевые и токсикологические свойства минеральных элементов

Элемент	Функции	Эффекты, вызванные дефицитом элемента	Нежелательные эффекты, вызванные избыточным потреблением	Пищевые источники
Кальций	Минерализация костей и зубов, свертывание крови, секреция гормонов, трансмиссия нервных импульсов.	Повышенный риск остеопороза, гипертония, некоторые виды рака	Избыточное потребление встречается редко; может вызвать образование почечных камней, молочно-щелочной синдром	Молоко, йогурт, сыр, обогащенные соки, тофу, кале, брокколи
Фосфор	Минерализация костей; синтез ДНК и РНК; синтез фосфолипидов, энергетический метаболизм, клеточная сигнализация	Дефицит встречается редко из-за повсеместной распространенности фосфора в пище, низкий уровень потребления может вызвать ослабление минерализации костей	Замедленное образование костей, почечные камни, пониженная абсорбция Ca и Fe, дефицит железа и цинка из-за повышенного потребления фитатов.	Присутствует почти во всех видах продуктов, особенно в высокобелковых (мясо, молоко, и т. д.), злаках, безалкогольных напитках (в виде H_3PO_4).
Магний	Кофактор для многих ферментов	Дефицит встречается редко, за исключением некоторых клинических случаев, недостаток Mg наблюдается часто у выздоравливающих после сердечно-сосудистых операций	Встречается редко, за исключением избыточного потребления Mg-содержащих добавок. Вызывает кишечные боли, диарею, спазмы, тошноту	Зеленые листовые овощи, молоко, цельные зерна
Натрий	Основной катион во внеклеточной жидкости, контролирует ее объем и кровяное давление, необходим для переноса многих нутриентов в /из клеток	Дефицит встречается редко, за исключением людей, занимающихся видами спорта, связанными с большими физическими нагрузками. Дефицит может вызвать мускульные судороги	Высокое потребление может вызвать гипертонию у чувствительных к соли людей	В натуральных продуктах содержится мало Na. Приготовленные продукты содержат различные количества Na
Железо	Перенос кислорода (гемоглобин и миоглобин), дыхание и энергетический метаболизм (цитохромы и железосерные протеины), разложение пероксида водорода (пероксидаза и каталаза), синтез ДНК (рибонуклеотид редуктаза)	Дефицит широко распространен и вызывает усталость, анемию, понижение работоспособности, понижение умственных способностей, ослабление иммунного отклика	Избыток железа приводит к повышению риска возникновения некоторых видов рака и сердечно-сосудистых заболеваний	Мясо, продукты из злаков, обогащенные продукты, зеленые листовые овощи
Цинк	Кофактор в металлоферментах, регуляция экспрессии генов	Замедление роста, полового созревания, иммунного отклика, залечивания ран	Ингибирование абсорбции Cu и Fe, ослабление иммунного отклика	Красное мясо, моллюски, пшеничные зародыши, обогащенные продукты
Иод	Необходим для синтеза гормонов щитовидной железы	Зоб, замедление умственного развития, пониженная способность к деторождению, кретинизм	Редко встречается у йододостаточных людей, гипертиреоидизм у йоддефицитных людей	Йодированная соль, морские водоросли, морепродукты
Селен	Антиоксидант (как компонент пероксидаз)	Миокардиты, остеоартриты, повышение риска заболевания некоторыми видами рака	Потеря волос и ногтей, повреждения кожи, тошнота	Злаки, растущие на богатых Se почвах, мясо, обогащенное селеном

Таблица 8.2 (окончание)

Элемент	Функции	Эффекты, вызванные дефицитом элемента	Нежелательные эффекты, вызванные избыточным потреблением	Пищевые источники
Свинец	Не является необходимым нутриентом	Нет	Проблемы в обучении и поведении детей, анемия, поражение почек	Примеси Pb могут поступать в продукты из банок, содержащих Pb, этилированного бензина, керамики
Ртуть	Не является необходимым нутриентом	Нет	Потеря чувствительности, зрения и слуха	Рыба (особенно долгоживущие хищные виды)
Кадмий	Неизвестны	Подавление роста крыс	Поражение почек, болезни костей, рак	Зерновые и овощи, растущие на загрязненной кадмием почве

допустимый уровень потребления (*UL*). Каждое из этих значений основывается на специфических критериях, используемых при их оценке. Краткое описание указанных показателей приведено ниже. Более подробная информация приводится в работе [103].

Оценочная средняя потребность (EAR) — это средний уровень потребления, отвечающий потребностям 50% людей определенного возраста и пола; предполагается, что уровень потребления второй половины выше, чем *EAR*.

Рекомендуемые нормы потребления (RDA) — это уровень потребления, отвечающий потребностям практически всех здоровых людей определенного пола и возраста. Эта величина связана с *EAR* следующим соотношением: $RDA = EAR + 2\ SD$, где SD – стандартное отклонение.

Адекватный уровень потребления (AI) используется тогда, когда отсутствуют научные данные, необходимые для определения *RDA*. *AI* рассчитывают исходя из оценок современного потребления данного нутриента здоровыми людьми, а не по результатам контрольных исследований, имеющих целью определение индивидуальных потребностей в нутриенте.

Верхний допустимый уровень потребления (UL) — это наибольший уровень потребления, который не представляет опасности неблагоприятных воздействий на состояние здоровья практически у всех лиц данной группы. При увеличении потребления сверх этих величин возрастает риск неблагоприятных эффектов.

Графически *EAR, RDA, AI* и *UL* представлены на рис. 8.7.

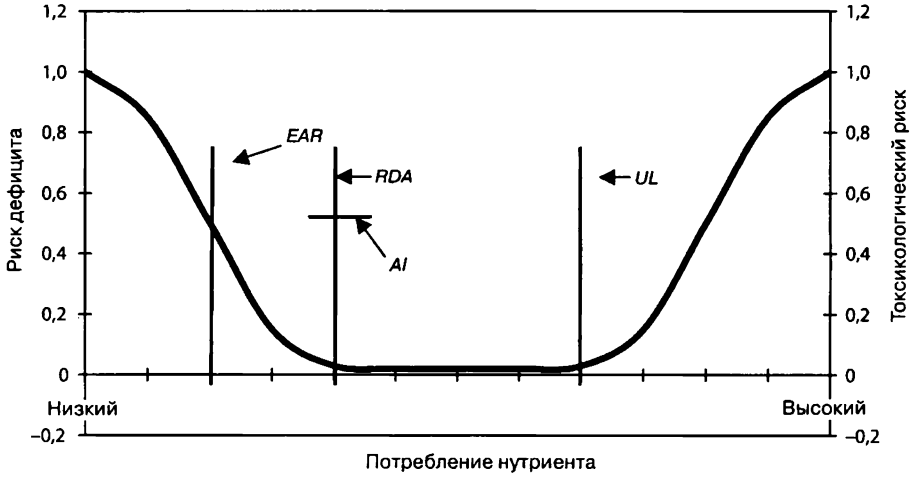


Рис. 8.7. Риск дефицита (левая вертикальная ось) или избытка (правая вертикальная ось) в зависимости от уровня потребления. Если потребление увеличивается, риск дефицита уменьшается и приближается к нулю. Если потребление увеличивается сверх безопасного уровня, возрастает токсикологический риск. По [103]

DRI получены только для 9 из 25 минеральных элементов, известных как эссенциальные (Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu, Cr, Mn, I). Значения *DRI* для наиболее важных из них приведены в табл. 8.3 [39] и 8.4 [38, 39].

Таблица 8.3

***DRI* эссенциальных минеральных веществ (Ca, P и Mg)[a]. По [39, см. http://www.iom.edu/file.asp?id=7294]**

Возраст	Кальций, мг/сут. *RDA/AI/UL*	Фосфор, мг/сут. *RDA/AI/UL*	Магний, мг/сут. *RDA/AI/UL*
Новорожденные			
0–6 мес	210/N.D.[b]	**100**/ND	30/N.D.
7–12 мес	270/N.D.	**275**/ND	75/N.D.
Дети			
1–3 года	500/2500	**460**/3000	**80**/65
4–8 лет	800/2500	**500**/3000	**130**/110
Мужчины			
9–13 лет	1300/2500	**1250**/4000	**240**/350
14–18 лет	1300/2500	**1250**/4000	**410**/350
19–30 лет	1000/2500	**700**/4000	**400**/350
31–50 лет	1000/2500	**700**/4000	**420**/350
50–70 лет	1200/2500	**700**/4000	**400**/350
> 70 лет	1200/2500	**700**/3000	**400**/350
Женщины			
9–13 лет	1300/2500	**1250**/4000	**240**/350
14–18 лет	1300/2500	**1250**/4000	**360**/350
19–30 лет	1000/2500	**700**/4000	**310**/350
31–50 лет	1000/2500	**700**/4000	**320**/350
50–70 лет	1200/2500	**700**/4000	**320**/350
> 70 лет	1200/2500	**700**/3000	**320**/350
Беременные женщины			
< 18 лет	1300/2500	**1250**/3500	**400**/350
19–30 лет	1000/2500	**700**/3500	**350**/350
31–50 лет	1000/2500	**700**/3500	**350**/350
Кормящие матери			
< 18 лет	1300/2500	**1250**/4000	**360**/350
19–30 лет	1000/2500	**700**/4000	**310**/350
31–50 лет	1000/2500	**700**/4000	**320**/350

[a] Значения *RDA* показаны жирным шрифтом, *AI* – светлым шрифтом. Первые числа для каждого элемента — это *RDA* или *AI*. Например, для кальция приведены только значения *AI*, для фосфора — только *RDA*, а для магния — иногда *AI*, иногда *RDA*. Значения *UL* приводятся за косой чертой /. В большинстве случаев *UL* есть потребление из всех источников (еда, вода и БАД). В случае магния, однако, значение *UL* соответствуют только потреблению из БАД.

[b] N.D. = не определено *Food and Nutrition Board* из-за отсутствия надежных данных

8.3.3. Усвояемость минеральных элементов

Наличие нутриента в пищевом продукте не всегда служит надежным показателем того, что продукт является источником этого нутриента. Это привело к необходимости разработки концепции биоусвояемости нутриентов, определяемой как доля нутриента в пище, способная метаболизироваться. В случае минеральных нутриентов биоусвояемость определяется прежде всего эффективностью их всасывания из просвета кишечника в кровь. В некоторых случаях, однако, всасываемые нутриенты могут находиться в неусваиваемой форме. Например, в отдельных хелатах железо связано так прочно, что даже если эти хелаты всасываются, металл, необходимый для железосодержащих протеинов, не может поступить в клетки и выводится с мочой в форме комплекса.

Таблица 8.4

DRI эссенциальных микроэлементов (Fe, Zn, Se, I и F)[a]. По [38, 39, см. http://www.iom.edu/file.asp?id=7294)

Возраст	Fe, мг/сут., *RDA* или *AI*/*UL*	Zn, мг/сут., *RDA* или *AI*/*UL*	Se, мкг/сут., *RDA* или *AI*/*UL*	I, мкг/сут., *RDA* или *AI*/*UL*	F^-, мг/сут., *RDA* или *AI*/*UL*
Новорожденные					
0–6 месяцев	0,27/40	2/4	15/45	110/N.D.[b]	0.01/0.7
7–12 месяцев	**11**/40	**3**/5	20/60	130/N.D.	0.5/0.9
Дети					
1–3 года	7/40	**3**/7	**20**/90	**90**/200	0.7/1.3
4–8 лет	**10**/40	**5**/12	**30**/150	**90**/300	1/2.2
Мужчины					
9–13 лет	**8**/40	**8**/23	**40**/280	**120**/600	2/10
14–18 лет	**11**/45	**11**/34	**55**/400	**150**/900	3/10
19–30 лет	**8**/45	**11**/40	**55**/400	**150**/1100	4/10
31–50 лет	**8**/45	**11**/40	**55**/400	**150**/1100	4/10
50–70 лет	**8**/45	**11**/40	**55**/400	**150**/1100	4/10
> 70 лет	**8**/45	**11**/40	**55**/400	**150**/1100	4/10
Женщины					
9—13 лет	**8**/40	**8**/23	**40**/280	**120**/600	2/10
14–18 лет	**15**/45	**9**/34	**55**/400	**150**/900	3/10
19–30 лет	**18**/45	**8**/40	**55**/400	**150**/1100	3/10
31–50 лет	**18**/45	**8**/40	**55**/400	**150**/1100	3/10
50–70 лет	**8**/45	**8**/40	**55**/400	**150**/1100	3/10
> 70 лет	**8**/45	**8**/40	**55**/400	**150**/1100	3/10
Беременные женщины					
<18 лет	**27**/45	**12**/34	**60**/400	**220**/900	3/10
19–30 лет	**27**/45	**11**/40	**60**/400	**220**/1100	3/10
31–50 лет	**27**/45	**11**/40	**60**/400	**220**/1100	3/10
Кормящие матери					
< 18 лет	**10**/45	**13**/34	**70**/400	**290**/900	3/10
19–30 лет	**9**/45	**12**/40	**70**/400	**290**/1100	3/10
31–50 лет	**9**/45	**12**/40	**70**/400	**290**/1100	3/10

[a] Значения *RDA* показаны жирным шрифтом, а *AI* — светлым. Первые числа для каждого элемента — это *RDA* или *AI*. Например, для железа приведены только значения *RDA*, а для фторида — только *AI*. Значения *UL* приведены после косой черты (/).

[b] N.D. = не определено *Food and Nutrition Board* из-за отсутствия надежных данных.

Биоусвояемость минеральных нутриентов меняется в широких пределах — от 1% для некоторых форм железа до более 90% для натрия и калия (табл. 8.5). Причин тому достаточно много. Одной из главных является растворимость нутриента в содержимом тонкого кишечника — нерастворимые вещества не могут проходить через мембраны энтероцитов и, следовательно, всасываться. Многие повышающие и понижающие усвояемость факторы действуют именно путем влияния на растворимость.

8.3.3.1. Факторы повышения биоусвояемости

8.3.3.1.1. Органические кислоты

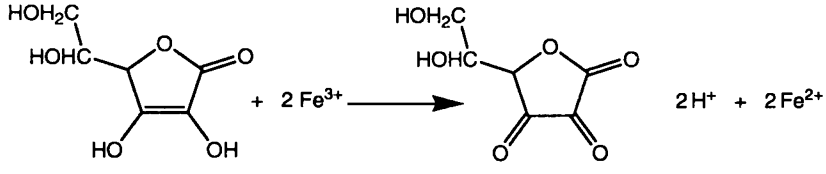
Биоусвояемость минеральных элементов повышают некоторые органические кислоты. Степень этого повышения зависит от состава пищи, природы минерального вещества, концентраций кислоты и нутриента. Наиболее известными органическими кислотами, увеличивающими усвояемость, являются аскорбиновая, лимонная и молочная. По-видимому, эффект, вызываемый этими кислотами, обусловлен образова-

Таблица 8.5
Факторы, влияющие на усвояемость минеральных элементов из пищевых продуктов

1. Химическая форма минерального элемента в пище
a. Плохо растворимые формы всасываются плохо
b. Растворимые хелаты могут плохо всасываться, если хелат очень стабилен
c. Гемовое железо из большинства продуктов всасывается лучше, чем негемовое
2. Пищевые лиганды
a. Лиганды, образующие с металлами растворимые хелаты, могут повышать их всасывание, например, ЭДТА повышает всасывание железа из некторых видов пищи
b. Трудно перевариваемые высокомолекулярные лиганды (пищевые волокна, некоторые белки) могут снижать всасывание
c. Лиганды, образующие с металлами трудно растворимые хелаты, могут снижать всасывание (например, оксалат замедляет всасывание кальция, фитиновая кислота — кальция, железа и цинка)
3. Окислительно-восстановительная активность пищевых компонентов
a. Восстановители (например, аскорбиновая кислота) повышают всасывание железа, но мало влияют на всасывание других элементов
b. Окислители понижают всасывание железа
4. Взаимодействия «минеральный элемент–минеральный элемент»
a. Высокие концентрации одного минерального элемента могут отрицательно влиять на всасывание другого (например, кальций ингибирует всасывание железа, железо — цинка, свинец — железа)
5. Состояние здоровья потребителя
a. Гомеостатические механизмы могут корректировать содержание минерального элемента (Fe, Zn и Ca) по месту его всасывания (повышать при дефиците и понижать при избыточном потреблении)
b. Нарушения всасывания (например, болезнь Крона, целиакия) могут понизить всасывание минеральных и других нутриентов
c Ахлоргидрия (пониженная секреция кислоты в желудке) может ослабить всасывание Fe и Ca
d. С возрастом обычно всасывание понижается
e. При беременности всасывание железа увеличивается

нием растворимых хелатов, которые предохраняют минеральные элементы от осаждения и/или связывания другими лигандами, что может уменьшить всасывание.

Особенно сильно увеличивает всасывание железа аскорбиновая кислота, являющаяся не только хелатным агентом, но и сильным восстановителем, переводящим Fe^{3+} в более растворимую и усвояемую форму Fe^{2+} [104]:



Аскорбиновая кислота Дегидроаскорбиновая кислота

Вместе с тем на усвояемость других минеральных веществ аскорбиновая кислота влияет слабо, так как в отличие от Fe^{3+} она не восстанавливает их ионы.

8.3.3.1.2. «Мясной фактор»

Мясо млекопитающих, птицы и рыбы улучшает всасывание негемового и гемового железа [120]. К сожалению, многочисленные попытки идентифицировать и изолировать предполагаемый «мясной фактор» оказались безрезультатными. Известно, что мясо восстанавливает Fe^{3+} до Fe^{2+} [58], чем, возможно, и объ-

ясняется его положительное влияние на усвояемость железа. Кроме того, вещества, содержащиеся в мясе (в частности, аминокислоты и полипептиды), могут образовывать с железом хелатные комплексы, достаточно хорошо растворимые в содержимом тонкого кишечника.

8.3.3.2. Факторы снижения биоусвояемости

8.3.3.2.1. Фитиновая кислота

Отрицательное влияние на биоусвояемость минеральных элементов оказывают фитиновая кислота и ее комплексы — фитаты. Эти соединения являются важнейшими фосфорсодержащими соединениями, присутствующими в семенах растений. Фитиновая кислота (*мио*-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат) содержит шесть фосфатных групп, этерифицированных инозитолом (рис. 8.8). Фосфатные группы ионизируются при физиологическом значении pH, и поэтому фитиновая кислота является мощным хелирующим агентом для катионов, особенно двух- и трехзарядных — Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+} и Mg^{2+} (рис. 8.9) [61]. Связанные в хелаты элементы плохо усваиваются, что обусловливает антинутритивные свойства фитатов.

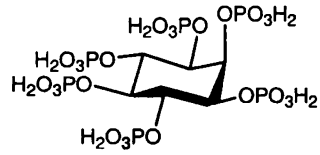


Рис. 8.8. Строение фитиновой кислоты

Помимо хранения фосфора в семенах растений, фитиновая кислота и ее производные участвуют в процессах преобразования сигнала и, возможно, экспорта АТФ и РНК, а также репарации и рекомбинации ДНК [89]. Фитиновая кислота гидролизуется ферментами — фитазами. Частичный гидролиз приводит к образованию смеси инозитолфосфатов с различным числом фосфатных групп (рис. 8.9). Фитиновая кислота и продукты ее гидролиза обозначаются IP6, IP5, IP4 и так далее — цифры в этих символах указывают на число фосфатных групп, этерифицированных инозитолом. Гидролиз фитиновой кислоты приводит к понижению всасывания минеральных элементов, однако продукты гидролиза, как и исходная кислота, ингибируют всасывание железа [95].

В злаках и бобах концентрация фитатов составляет 1–3%, а в корнеплодах, клубнях и овощах — доли процента [95]. Поскольку в большинстве растений содержатся эндогенные фитазы, активность которых может повышаться при получении пищевых продуктов, в них присутствует смесь инозитолгексафосфата и различных продуктов гидролиза. Содержание инозитолфосфатов в некоторых пищевых продуктах приведено в табл. 8.6 [46]. Из сравнения содержания фитатов в отрубях и очищенных злаках видно, что фитаты концентрируются в оболочке зерна, тогда как содержание их в эндосперме относительно невелико. В плодах бобовых фитаты распределены более равномерно, причем концентрация их весьма высока.

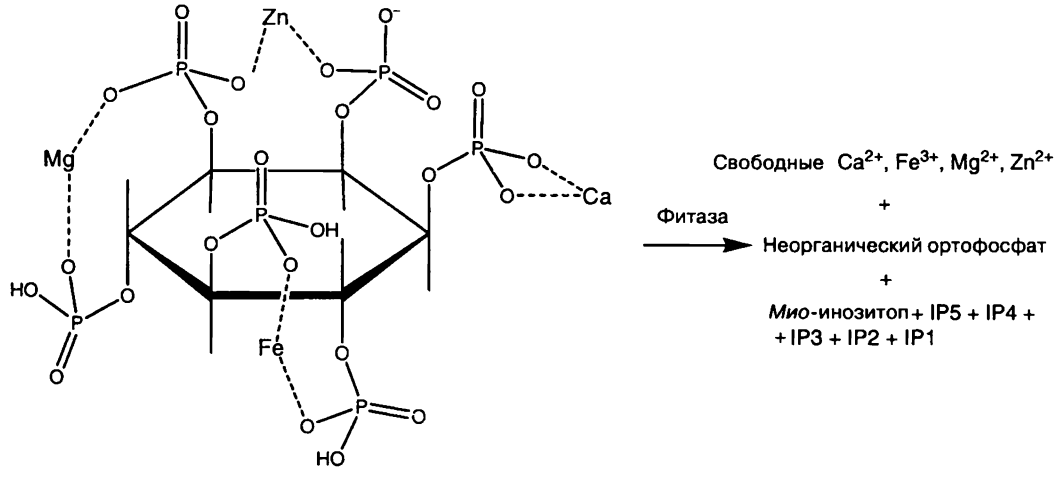


Рис. 8.9. Проекция Хейуорта, показывающая возможную структуру фитатов магния, цинка, кальция и железа. Фитазы катализируют отщепление фосфатных групп, в результате чего образуется смесь свободного инозитола (инозита), инозитолфосфатов, неорганического фосфата и катионов металлов, часть которых остается связанной частично гидролизованной фитиновой кислотой. По [61]

Таблица 8.6

Содержание инозитолгексакисфосфата (IP6) и продуктов его гидролиза (IP3, IP4 и IP5) в пищевых продуктах, мкмоль/г пищевого продукта. По [46]

Пищевой продукт	IP3	IP4	IP5	IP6
Хлеб	0,3	0,2	0,5	3,2
Текстурированная соевая мука		0,9	4,4	21,8
Кукурузная крупа (*Quaker*)	Следы	0,03	0,3	2,0
Кукурузные хлопья (*Kelloggs*)	Следы	0,06	0,09	0,07
Цельнозерновые завтраки (*Cheerios, General Mills*)	0,06	2,2	4,6	5,1
Овсяные отруби (*Quaker*)	0,07	1,0	5,6	21,2
Овсяная мука (*Quaker*)	0,08	0,7	3,0	10,3
Рисовые хлопья (*Kelloggs*)	0,05	0,4	0,9	1,2
Дробленая пшеница (*Nabisco*)	0,1	0,7	3,2	9,7
Зерновые завтраки (*Wheaties, General Mills*)	0,6	1,8	3,7	5,1
Отруби (*All Bran, Kelloggs*)	0,8	3,9	11,5	22,6
Нут (турецкий горох)	0,1	0,56	2,04	5,18
Красная фасоль	0,19	1,02	2,81	9,12

Приведенные факты свидетельствуют, что понижение концентрации фитатов будет способствовать большей усвояемости минеральных элементов. С этим связаны усилия селекционеров, направленные на выведение сортов злаковых и бобовых с пониженным содержанием фитатов [88]. В Малави предпринимались также попытки уменьшить количество фитатов за счет активирования эндогенных фитаз [67], для чего кукурузная мука замачивалась на ночь в воде. Несмотря на то что небольшого улучшения усвояемости железа достичь удалось, эффективность данного метода весьма мала [62].

Следует также иметь в виду, что хотя для улучшения усвояемости минеральных элементов следует снижать содержание фитатов, это может привести к отрицательному эффекту — в опытах с животными получены убедительные доказательства антиканцерогенных свойств фитиновой кислоты [41,108]. Механизм протекторного действия фитиновой кислоты изучен слабо. Возможно, он обусловлен антиоксидантным эффектом за счет связывания железа и меди.

8.3.3.2.2. Полифенольные соединения

Полифенольные соединения понижают усвояемость железа из пищи [119, 122]. Особенно сильным ингибитором является чай (по-видимому, благодаря высокому содержанию таннина). К другим богатым полифенолами пищевым продуктам относятся кофе, цветные бобы, изюм и сорго [43, 119].

8.3.4. Эссенциальные минеральные вещества в питании. Общие сведения

Рассмотрим процесс переваривания и всасывания минеральных нутриентов, поступающих в организм с пищей [74]. Сначала пища пережевывается во рту, при этом в присутствии амилазы слюны начинается переваривание крахмала. На этой стадии структура и свойства минеральных веществ почти не меняются. Затем пища проглатывается и поступает в желудок, где желудочные кислоты снижают значение pH до примерно 2, что серьезно отражается на свойствах минеральных веществ (меняется стабильность их комплексов). Кроме того, на нее влияют денатурация белков, а также гидролиз. Минеральные вещества могут поступать в раствор и образовывать комплексы с другими лигандами. От значения pH существенно зависит окислительно-восстановительное поведение железа. В нейтральных средах даже в присутствии избытка восстановителей (например, аскорбиновой кислоты) Fe^{3+} не вступает в окислительно-восстановительные реакции, однако в кислых средах аскорбиновая кислота быстро восстанавливает Fe^{3+} до Fe^{2+} Поскольку Fe^{2+} имеет меньшее сродство к основной массе лигандов, чем Fe^{3+}, железо будет выделяться из комплексов в пищу.

Частично переваренная в желудке пища поступает затем в тонкий кишечник, в котором за счет секретов поджелудочной железы, содержащих бикарбонат натрия и ферменты, значение pH повышается

и продолжается процесс переваривания белков, липидов и крахмала. Образуются новые лиганды, а свойства уже имеющихся лигандов изменяются, что сказывается на их сродстве к ионам металлов. Изменение состава минеральных веществ происходит в просвете тонкого кишечника, при этом образуется сложная смесь растворимых и нерастворимых, высоко- и низкомолекулярных соединений. Растворимые вещества, в том числе несвязанные ионы минеральных веществ, могут диффундировать к эпителиальным клеткам кишечника, покрытым микроворсинками, где они поглощаются энтероцитами или проходят между клетками (парацеллюлярный транспорт). Всасывание, которому может способствовать мембранный носитель или ионный канал, может быть активным энергозатратным или насыщаемым процессом, а также может регулироваться физиологическими процессами.

Все это свидетельствует, что процессы всасывания минеральных веществ и влияющие на них факторы чрезвычайно сложны. Остаются невыясненными многие изменения, происходящие с минеральными веществами при переваривании пищи. Тем не менее, результаты сотен исследований позволили выявить основные факторы, влияющие на усвояемость минеральных веществ; часть из которых представлена в табл. 8.5.

8.3.5. Отдельные минеральные вещества в питании

Благодаря целому комплексу причин дефицит одних элементов достаточно широко распространен, тогда как для других он встречается редко или вообще не характерен. Кроме того, уровень дефицита зависит от географических и социоэкономических условий. Известен дефицит кальция, кобальта (в виде витамина B_{12}), хрома, йода, железа, селена и цинка [48]. Кальций, хром, железо и цинк находятся в продуктах в связанной форме, и поэтому их низкая усвояемость может быть обусловлена составом пищи. Следовательно, дефицит этих элементов может быть вызван как плохой усвояемостью, так и низким уровнем потребления.

Йод присутствует в пище преимущественно в ионной, несвязанной форме, усвояемость которой весьма высока. Таким образом, причиной дефицита йода является его малое потребление. Селен присутствует в пищевых продуктах в основном в виде легкоусвояемого селенметионина, и поэтому его дефицит также связан с низким уровнем потребления. Дефицит витамина B_{12} (кобальта) встречается в основном у людей-вегетарианцев, в рационе которых содержание этого витамина очень мало, или у пациентов с определен-

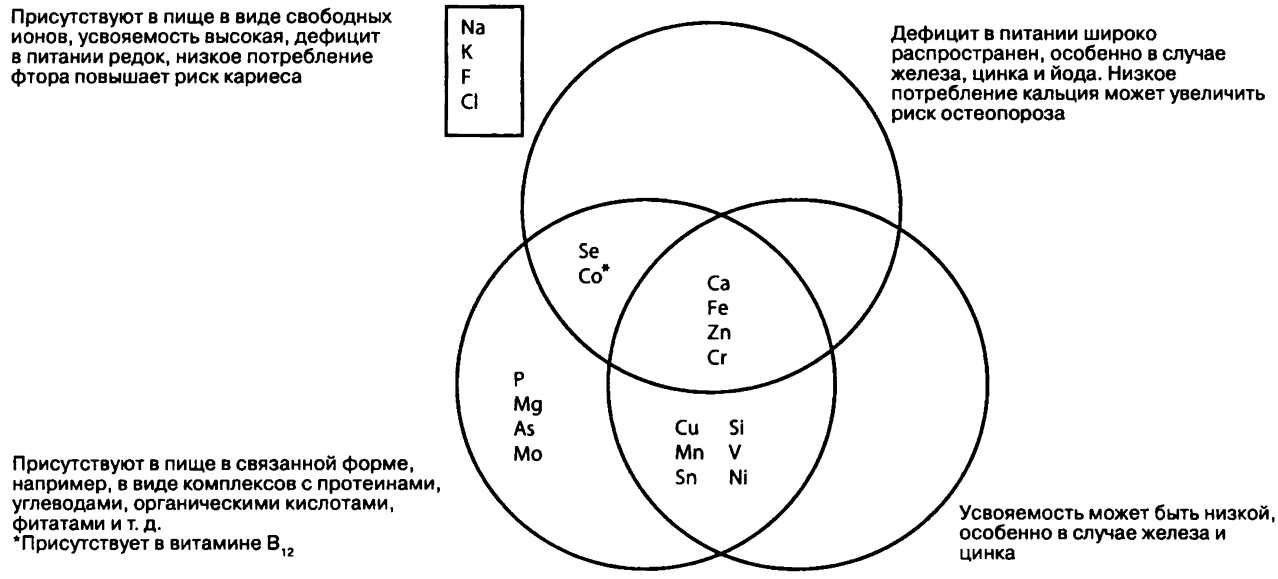


Рис. 8.10. Классификация эссенциальных минеральных элементов в зависимости от формы их присутствия в пище (свободной или связанной в виде комплексов или хелатов), биоусвояемости, а также частоты дефицитов в популяции

ным метаболическим синдромом. Эти примеры иллюстрируют сложность биоусвояемости минеральных веществ. Некоторые связанные формы минеральных веществ имеют низкую биоусвояемость, тогда как другие — высокую. В целом несвязанные формы характеризуются высокой биоусвояемостью. Современные представления об усвояемости и дефиците элементов показаны на рис. 8.10. В США наибольшей проблемой является дефицит кальция и железа, а в развивающихся странах — железа и йода.

8.3.5.1. Кальций

В организме взрослых мужчин и женщин содержится соответственно около 1200 и 1000 г кальция — это наиболее распространенный в организме минеральный элемент. Более 99% кальция находится в костях [111]. Кроме структурной функции кальций играет важную регулирующую роль во многих биохимических и физиологических процессах, лежащих в основе жизнедеятельности растений и животных. Например, кальций участвует в фотосинтезе, окислительном фосфорилировании, свертывании крови, сокращении мышц, делении клеток, передаче нервных импульсов, функционировании ферментов и клеточных мембран, в клеточной адгезии и секреции гормонов.

Кальций находится в организме в виде двухвалентного иона радиусом 99 пм. Его вовлеченность во многие процессы, протекающие в живых клетках, обусловлена способностью образовывать комплексы с белками, углеводами и липидами. Кальций связывается весьма селективно. Его способность присоединяться к атому кислорода в спиртовых и карбонильных группах, а также образовывать связи одновременно с двумя центрами определяет возможность образовывать перекрестные связи белков и углеводов [24].

Адекватные уровни потребления кальция приведены в табл. 8.3 и изменяются от 210 мг/сут для новорожденных до 1300 мг/сут для подростков, беременных и кормящих женщин. Потребление кальция большей частью населения США лежит ниже адекватного уровня, что может приводить к хроническим заболеваниям, в том числе остеопорозу, гипертонии и некоторым формам онкологических заболеваний. Большинство исследований влияния потребления кальция на здоровье посвящено проблеме остеопороза, которым больны более 10 млн американцев, а еще 34 млн относятся к группе риска [80]. В результате остеопороза снижается масса костей. Страдающие этой болезнью люди более подвержены переломам, особенно шейки бедра, запястий и позвоночника. Хотя возникновению остеопороза способствуют многие факторы, одним из основных является именно дефицит кальция и витамина D.

8.3.5.1.1. Биоусвояемость кальция

Количество усвоенного организмом кальция зависит от его концентрации в пищевых продуктах и присутствия веществ, понижающих или повышающих его усвояемость [112]. Эффективность всасывания кальция, выраженная в процентах от массы кальция, поступившего в организм с пищей, логарифмически обратно пропорциональна этой массе [50]. Данная зависимость наблюдается в широком диапазоне количеств потребляемого кальция. Главные ингибиторы всасывания кальция — оксалат и фитат, причем оксалат является наиболее мощным ингибитором, поскольку ионы кальция образуют с оксалатом очень плохо растворимый хелатный комлекс (рис. 8.11). Предполагается, что пищевые волокна слабо влияют на всасывание кальция [112].

Содержание кальция в различных пищевых продуктах и данные по его усвояемости приведены в табл. 8.7, из которой видно, что в порции обогащенного кальцием фруктового сока содержится больше усваиваемого кальция, чем в порции молока. Без потребления молока и других богатых кальцием продуктов трудно достичь рекомендуемых норм потребления этого элемента.

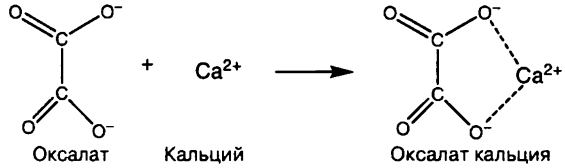


Рис. 8.11. Образование оксалата кальция из иона кальция и оксалата. Растворимость оксалата кальция не более 0,04 ммоль/л

Из приведенных данных следует, что содержание кальция и его усвояемость меняется в достаточно широких пределах. Доля кальция, всасываемого из молока, ниже, чем из других продуктов, не потому, что он присутствует в связанной форме, а из-за его большой концентрации. Плохая усвояемость кальция из шпината и пятнистой фасоли объясняется, по-видимому, присутствием, соответственно, оксалата и фитата.

Таблица 8.7
Содержание кальция в пищевых продуктах и его усвояемость. По [112]

Продукт	Масса порции, г	Содержание кальция, мг	Усваиваемая часть, %	Масса усвоенного кальция, мг	Количество порций продукта, содержание Са в которых равно его содержанию в 240 г молока
Молоко	240	300	32,1	96,3	1,0
Миндаль	28	80	21,2	17,0	5,7
Пятнистая фасоль	86	44,7	17,0	7,6	12,7
Брокколи	71	35	52,6	18,4	5,2
Кочанная капуста	75	25	64,9	16,2	5,9
Цветная капуста	62	17	68,6	11,7	8,2
Лимонный пунш с цитрат-малеатом кальция	240	300	50,0	150	0,64
Кормовая капуста (кале)	65	47	58,8	27,6	3,5
Соевое молоко	120	5	31,0	1,6	6,4
Шпинат	90	122	5,1	6,2	15,5
Тофу	126	258	31,0	80,0	1,2
Турнепс	72	99	51,6	31,1	1,9
Кресс водяной	17	20	67,0	13,4	7,2

8.3.5.2. Фосфор

Фосфор широко распространен в живых системах вследствие той роли, которую он играет в клеточных мембранах и практически всех метаболических процессах. В мягких тканях фосфор содержится в виде неорганического фосфата, главным образом HPO_4^{2-}, а также составной части многих органических молекул. В организме взрослого человека содержится до 850 г фосфора, из которых 85% находится в скелете в форме гидроксиапатита $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Соотношение массы кальция и фосфора в костях поддерживается на почти постоянном уровне и составляет приблизительно 2:1 [4].

Среди органических фосфатов, присутствующих в живых системах, следует отметить фосфолипиды, образующие липидный бислой всех клеточных мембран, ДНК и РНК, АТФ и креатинфосфат, циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) (внутриклеточный вторичный мессенджер) и многие другие. Таким образом, фосфор необходим для размножения клеток, их целостности, транспорта нутриентов через мембраны, энергетического метаболизма и регулирования метаболических процессов.

Рекомендуемые нормы потребления фосфора изменяются от 100 мг/сут для новорожденных до 1250 мг/сут для подростков, беременных и кормящих женщин (см. табл. 8.3). Эти нормы очень близки к адекватному уровню потребления кальция, однако в отличие от кальция, дефицит фосфора встречается довольно редко (за исключением людей с нарушениями метаболизма). Причина этого — уже упоминавшаяся широкая распространенность фосфора в пищевых продуктах.

Наиболее богаты им продукты с высоким содержанием белка — мясо, птица и рыба. Много фосфора содержат также продукты из цельного зерна и бобовых, однако большая часть его находится в виде фитата — главного фосфоросодержащего соединения семян. В отличие от неорганических и большей части органических фосфатов, фитаты усваиваются плохо и могут ингибировать всасывание некоторых микроэлементов (см. раздел 8.3.3.2). В потребление фосфора вносят вклад также фосфаты из пищевых добавок, которые широко используются в подвергающихся технологической обработке пищевых продуктах и напитках, в том числе в производстве газированных напитков, сыров, мясных консервов, хлебобулочных изделиях и др. [30].

8.3.5.3. Натрий, калий и хлор

Натрий и калий относятся к щелочным металлам (группа I-A периодической таблицы). Они легко теряют свой валентный электрон (ns^1) и образуют одновалентный катион. В природе они существуют только в виде солей. Натрий является шестым по распространенности элементом земной коры благодаря огром-

ным залежам хлорида натрия. Калий существует в природе в виде KCl (сильвит) и $KCl{\cdot}MgCl_2{\cdot}6H_2O$ (карналлит). Он широко используется в удобрениях.

Натрий, калий и хлор относятся к эссенциальным нутриентам, однако их дефицит встречается редко, поскольку почти всегда их потребление превышает требуемое. Из-за трудности определения минимальных потребностей рекомендуемые уровни потребления не установлены. Потребление натрия разными людьми весьма различно и изменяется приблизительно в пределах 1,2–5,9 г в сутки [87].

Биоусвояемость натрия очень высока, около 95% натрия выводится в мочу. В организме человека с массой тела 70 кг содержится около 100 г натрия, 50% которого находится во внеклеточной жидкости, 40% — в костях и 10% — внутри клеток [87]. Натрий выполняет в организме много функций. Он является основным катионом (Na^+) внеклеточной жидкости, участвует в регулировании давления крови и транспорте многих нутриентов в клетки. Вместе с хлоридом натрий играет важную роль в регулировании объема внеклеточной жидкости [65]. Функции катионов натрия и анионов хлора тесно взаимосвязаны, и зачастую разделить их роли в метаболических процессах довольно трудно [87].

Считается, что уровень потребления соли большинством людей слишком высок, и даже небольшое его снижение уменьшило бы смертность от инфаркта и сердечно-сосудистых заболеваний [49]. Медицинские работники рекомендуют пищевым предприятиям и владельцам ресторанов и кафе снижать содержание соли в продуктах и готовых блюдах [79], а тем, кто готовит сам, советуют уменьшить использование соли при приготовлении пищи и выбирать продукты с пониженным ее содержанием. Минимальный уровень потребления натрия составляет примерно 500 мг/сут. Поскольку в NaCl натрий по массе составляет 40%, верхний уровень потребления (2400 мг) соответствует потреблению 6 г соли/сут. Большинство американцев потребляет ее значительно больше. Уровень потребления натрия взрослыми мужчинами и женщинами в США в 1991–1992 гг. составлял 3229 и 2386 мг соответственно [32]. Около 75% соли поступает в организм с продуктами, приобретенными в магазинах, что делает снижение потребления NaCl весьма проблематичным [63].

Около 25% взрослых американцев имеют высокое артериальное давление (гипертонию) и 50% — давление выше рекомендуемого. Почти половина американцев старше 60 лет являются гипертониками, причем в некоторых этнических группах это число еще больше. Например, гипертонией страдают более 80% афроамериканок старше 60 лет [63].

8.3.5.4. Железо

По распространенности в земной коре железо находится на четвертом месте. Оно необходимо почти для всех живых организмов. В биологических системах железо почти исключительно присутствует в виде хелатов с порфиринами или белками. Организм взрослых мужчин и женщин содержит соответственно около 4 и 2,5 г железа. Около двух третей этого железа функционально, то есть играет активную роль в процессах метаболизма. Оставшаяся треть у людей с повышенным содержанием железа локализуется преимущественно в печени, селезенке и костном мозге. Функциональное железо играет ключевую роль во многих биологических процессах, включая перенос кислорода (гемоглобин и миоглобин), дыхание и энергетический метаболизм (цитохромы и железо-серные протеины), разложение пероксида водорода (пероксидаза и каталаза) и синтез ДНК (рибонуклеотидредуктаза). Многие из указанных протеинов содержат гем — комплекс железа с протопорфирином IX (рис. 8.12). Вовлеченность железа в метаболические процессы обусловлена прежде всего его способностью принимать или отдавать электрон, то есть участвовать в окислительно-восстановительном цикле Fe^{3+} и Fe^{2+}

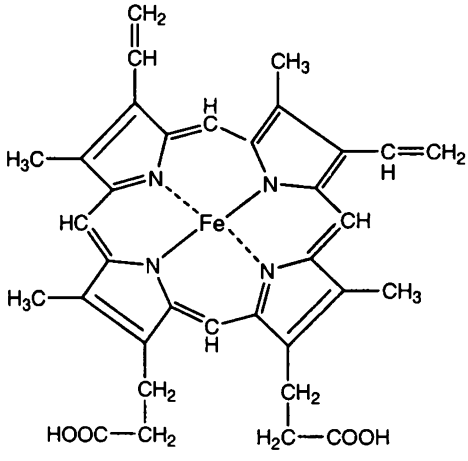


Рис. 8.12. Гем, хелатированное железо, обнаруженный во многих белках (гемоглобин, миоглобин, цитохромы и пероксидазы). Валентность железа может быть Fe^{+2} или Fe^{+3}

К сожалению, свободное железо может быть токсичным для живых клеток. По-видимому, эта токсичность связана с воз-

никновением активных форм кислорода, которые в свою очередь могут вызвать окисление липидов или атаковать молекулы протеинов или ДНК (см. ниже). Во избежание проявления токсических эффектов, вызванных свободным железом, практически все живые клетки используют механизм хранения лишнего железа в нетоксичной форме. Железо изолируется во внутренней полости белковой оболочки — апоферритина. Эта оболочка состоит из 24 полипептидных субъединиц, образующих сферу. Железо хранится в полости в виде полимерного оксигидроксида Fe^{3+} В одной ферритиновой оболочке может содержаться до 4500 ионов железа [16]. Ферритиновое железо представляет собой клеточный резерв, который может быть мобилизован для синтеза гемоглобина, миоглобина и других железосодержащих белков.

Несмотря на широкую распространенность железа в природе, его дефицит у людей, домашних животных и растений, растущих на определенных почвах, является серьезной проблемой. Так, в работе [99] отмечается, что в развивающихся странах у двух третей детей и женщин детородного возраста наблюдается дефицит железа; в индустриально развитых странах (США и др.) дефицит железа распространен меньше, но проблема ликвидации его дефицита еще далека от своего решения.

Кажущееся противоречие между распространенностью железа в природе и его дефицитностью как нутриента объясняется поведением железа в водных растворах. Железо является элементом с переходной валентностью, имеющим незаполненные *d*-орбитали. В большинстве природных объектов железо находится в состоянии Fe^{2+} (ферро) и Fe^{3+} (ферри). Феррожелезо имеет шесть *d*-электронов, а феррижелезо — пять. В водных растворах в восстановительной среде основной формой является Fe^{2+} Феррожелезо хорошо растворимо в воде при физиологических значениях pH. Молекулярным кислородом Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} и супероксида:

$$Fe^{2+}_{\text{гидро}} + O_2 \rightarrow Fe^{3+}_{\text{гидро}} + {}^{\bullet}O_2$$

Гидратированное железо Fe^{3+} затем гидролизуется с образованием плохо растворимых соединений [22]:

$$Fe(H_2O)_6^{+3} + H_2O \rightarrow Fe(H_2O)_5(OH^-)^{+2} + H_3O+ \rightarrow \rightarrow \rightarrow Fe(OH)_3$$

Поскольку гидролиз протекает в широком интервале значений pH раствора (за исключением сильнокислых сред), концентрация несвязанного Fe^{3+} становится очень малой. Этим и объясняется низкая усвояемость плохорастворимых форм железа.

Процесс всасывания железа протекает почти исключительно в кишечнике. Количество усвоенного железа определяется общим уровнем его потребления, рационом и формой, в которой этот элемент присутствует в пищевых продуктах.

В промышленно развитых странах питание обеспечивает поступление около 6 г железа в расчете на 1000 ккал (4187 кДж) [9]. Все железо в пище можно разделить на гемовое и негемовое. Гемовое железо прочно связано порфириновым лигандом (рис. 8.12) и не диссоциирует из комплекса до всасывания эпителиальными клетками кишечника. Оно присутствует прежде всего в гемоглобине и миоглобине продуктов животного происхождения — мясе, птице и рыбе. Практически все железо в растительной пище и 40–60% в пище животного происхождения находится в негемовой форме, связанной с белками и (в меньшей степени) с цитратом, фитатом, оксалатом, полифенолами и другими лигандами.

Усвояемость гемового железа слабо зависит от состава пищи и намного превышает усвояемость негемового железа, которое во многом определяется рационом. Считается, что негемовое железо из всех пищевых источников поступает при переваривании в общий пул, и его всасывание из этого пула определяется составом и количеством лигандов, присутствующих в перевариваемой пище при ее движении по желудочно-кишечному тракту.

Известен ряд усилителей и ингибиторов всасывания железа. К первым относятся мясо, птица, рыба, аскорбиновая кислота и ЭДТА (в рационах с малой усвояемостью). Ингибиторами являются полифенолы (таннины чая, бобовых культур, сорго), фитаты (в бобовых, цельнозерновых злаках), некоторые растительные белки (особенно белки бобовых), кальций и фосфаты. Таким образом, суммарная усвояемость железа определяется всем набором взаимодействий с усилителями и ингибиторами всасывания. Если

рацион состоит преимущественно из корнеплодов, клубнеплодов, бобовых, злаков и содержит мало мяса и аскорбиновой кислоты, усвояемость даже у людей с дефицитом железа составляет только около 5%. В этом случае питание обеспечивает поступление только около 0,7 мг усвояемого железа в сутки, что явно недостаточно для обеспечения потребности в этом элементе. Если рацион включает корнеплоды, злаки и бобовые, частично мясо, птицу или рыбу и содержащие аскорбиновую кислоту продукты, усвояемость железа составляет около 10% (1,4 мг/сут.). Этого количества достаточно для большинства мужчин, а также для женщин в период менопаузы, но недостаточно примерно для 50% женщин детородного возраста. Рацион, богатый мясом, птицей, рыбой и содержащий много аскорбиновой кислоты, обеспечивает поступление более 2 мг усвояемого железа в сутки, что отвечает потребности практически всех здоровых людей в данном элементе [9].

8.3.5.5. Цинк

Цинк присутствует в биологических системах в виде двухвалентного катиона Zn^{2+} Он не меняет свою валентность и поэтому не участвует непосредственно в окислительно-восстановительных реакциях, в отличие от других элементов с переменной валентностью — железа и меди. Цинк является сильной кислотой Льюиса и поэтому взаимодействует с электронодонорными лигандами. Прочно связываются цинком лиганды, содержащие сульфгидрильные (–SH) и аминогруппы, поэтому в биологических системах цинк образует комплексы преимущественно с белками [21].

Цинк участвует во многих метаболических процессах; идентифицировано более пятидесяти цинксодержащих ферментов, в том числе РНК-полимеразы, щелочная фосфатаза и карбоангидраза [21]. Цинк выполняет структурную и каталитическую функции. Он действует как антиоксидант, преимущественно в виде кофактора Cu/Zn супероксиддисмутазы. Этот элемент играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Рекомендуемые нормы потребления цинка изменяются в пределах от 2 мг/сут для новорожденных до 13 мг/сут для молодых кормящих матерей (см. табл. 8.4).

Дефицит цинка у людей и животных приводит к ослаблению иммунного отклика, замедлению заживления ран и плохому аппетиту. В 1961 г. в работе [86] впервые было установлено, что недостаток роста и задержки в половом созревании мальчиков связаны именно с дефицитом цинка. По-видимому, это объясняется избыточным потреблением хлеба с повышенным содержанием фитата [28]. Организм обладает ограниченными возможностями для депонирования цинка, поэтому дефицит цинка при низком уровне его потребления возникает довольно быстро [21].

Содержание и усвояемость цинка в зависимости от состава пищи меняется в широких пределах. Наиболее важными его источниками в США являются мясо и молоко [66, 68]. Если уровень потребления цинка низок, увеличивается его усвояемость и уменьшается эндогенная экскреция через кишечник [21]. Экскреция эндогенного цинка с фекалиями происходит из секреций в сок поджелудочной железы и непосредственно через энтероциты.

В присутствии фитиновой кислоты усвояемость цинка понижается. В связи с этим рацион, богатый продуктами из цельного зерна злаков и бобовых, может способствовать возникновению дефицита цинка. Продукты из муки высокой степени очистки содержат мало фитиновой кислоты, однако и концентрация цинка в них невелика, поскольку в зерне он присутствует преимущественно в отрубях и зародыше. В работе [96] показано, что суммарная усвояемость цинка из цельнозернового хлеба на 50% выше, чем из белого хлеба, и его всасывание составляет соответственно17 и 38%. Вегетарианская диета не совсем полноценна в отношении цинка. Его дефицит в развивающихся странах распространен намного шире, чем в развитых. В Мексике у 25% детей моложе 11 лет содержание цинка в сыворотке крови не превышает 10,0 мкмоль/л (0,65 мг/л) [94]. Очевидно, что это объясняется низким уровнем потребления мясных и молочных продуктов в развивающихся странах. Следует отметить, однако, что в развитых странах (например, в США) содержание цинка в организме вегетарианцев и невегетарианцев различается несущественно. Имеются, правда, данные о том, что хотя содержание цинка в плазме крови вегетарианцев не выходит за рамки приемлемого диапазона, оно находится на нижней границе нормы [54]. К сожалению, в настоящее время отсутствует чувствительный тест для определения маргинального дефицита цинка, что снижает достоверность этих результатов.

8.3.5.6. Йод

Йод необходим для синтеза гормонов щитовидной железы. Эти гормоны (тироксин, 3,4,3′,5′-тетрайодтиронин, обозначаемый как T_4, и 3,5,3′-трийодтиронин (T_3), выполняют в организме несколько функций [102] — они влияют на рост нервных клеток, умственное и физическое развитие детей, а также на базальную скорость метаболизма. Рекомендуемые нормы потребления йода варьируют от 90 мкг/сут для детей до 290 мкг/сут для кормящих матерей (см. табл. 8.4).

Неадекватное потребление йода является причиной целого ряда заболеваний, известных как йоддефицитные заболевания (*IDD*) [25, 26]. Наиболее известна баседова болезнь, однако существует и много других нарушений, вызываемых дефицитом йода — пониженная способность к деторождению, повышенная перинатальная смертность, задержки роста у детей, слабое умственное развитие [26]. Йоддефицитными заболеваниями страдают более 700 млн человек [118]. Недостаток йода — главная причина слабого умственного развития детей. Его наиболее тяжелая форма — кретинизм — проявляется у новорожденных, матери которых имели серьезный дефицит йода в период беременности.

Дефицит йода наблюдается прежде всего в районах, в которых почва бедна этим элементом из-за выщелачивания, вызываемого тающими ледниками (например, в горных районах Боливии), частыми ливнями и наводнениями [26]. Проблема недостатка йода обостряется при употреблении так называемых гойтрогенов — веществ, способствующих увеличению зоба. В частности, к этим веществам относится линамарин — тиогликозид, присутствующий в маниоке. Если его не удалить перед употреблением с помощью замачивания или иного способа, то попавший в кишечник линамарин будет гидролизовываться с образованием цианида, всасываться и переходить в тиоцианат. Последний взаимодействует с йодом в тканях щитовидной железы. Следует отметить, что гойтрогены опасны только при низком уровне потребления йода [102].

8.3.5.7. Селен

Селен входит в состав нескольких важных белков [20], включая глутатионпероксидазу, селенопротеин P плазмы крови, мышечный селенопротеин W и селенопротеины, присутствующие в простате и плаценте. Глутатионпероксидаза катализирует восстановление гидропероксидов, выполняя тем самым роль эффективного антиоксиданта. Известно также, что селен служит резервным веществом для витамина E — потребление этого витамина увеличивается при дефиците селена и уменьшается при адекватном его потреблении. Рекомендуемые нормы потребления селена составляют от 14 мкг/сут для новорожденных до 70 мкг/сут для кормящих матерей (см. табл. 8.4).

Селен находится в одной группе периодической таблицы с кислородом и серой (IV-A) и имеет сходные химические свойства. В животных тканях он присутствует преимущественно в виде селеноцистеина — аминокислоты, углеродный каркас которой аналогичен серину и цистеину (рис. 8.13).

Протеины, содержащие Se в стехиометрических пропорциях, называются селенопротеинами. Активной формой животных белков является селеноцистеин. Запасные функции выполняет селенометионин,

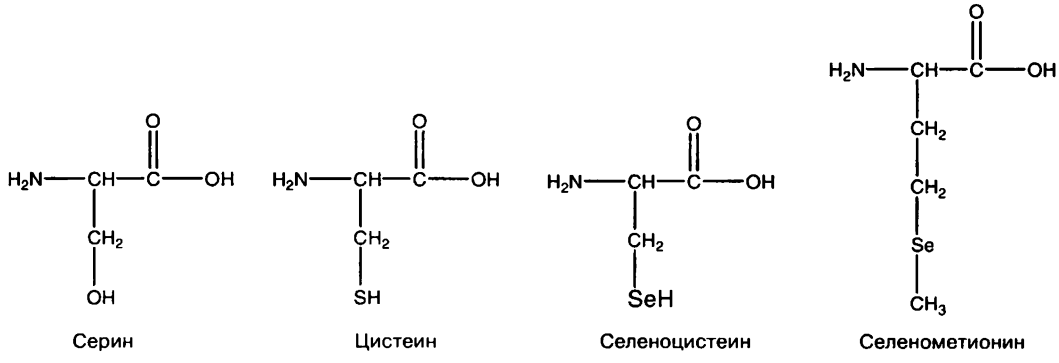


Рис. 8.13. Строение серина, цистеина, селеноцистеина и селенометионина. По [11]

присутствующий и в животных, и в растительных тканях как часть резервуара метионина [11]. Известно, что для растений селен не является эссенциальным элементом, однако концентрации селенометионина изменяются в растительных тканях в широких пределах в зависимости от содержания Se в почве.

Дефицит селена приводит к серьезным проблемам со здоровьем как животных, так и человека. Его недостаток широко распространен в мире, особенно в районах с низким содержанием селена в почве, где питание населения в значительной степени зависит от местных продуктов. В сельских районах Китая и восточной Сибири, почвы которых очень бедны селеном, часто встречаются болезни Кешана и Кашина-Бека [20]. Болезнь Кешана — это миокардит (воспаление среднего мускульного слоя сердечной стенки), проявляющийся в сердечной недостаточности, увеличенном размере сердца, сердечных аритмиях и других проблемах с сердцем. Дополнительное потребление Se в виде таблеток селенита (Na_2SeO_3) позволило в последние годы существенно уменьшить число страдающих этим заболеванием в Китае, однако в настоящее время установлено, что эта болезнь может вызываться разными причинами, в том числе вирусной инфекцией, опасной для людей с дефицитом селена [20]. Болезнь Кашина–Бека является формой остеоартрита, проявляющейся в деформации суставов и (в тяжелых случаях) карликовости. Связь этой болезни с дефицитом селена доказана, однако, как и в случае болезни Кешана, ее возникновение может быть обусловлено и другими факторами [11], в том числе микотоксинами зерна и некоторыми пока не известными органическими загрязнениями питьевой воды.

Получены также доказательства, что потребление селена в количествах, превышающих рекомендуемые, необходимо для предотвращения развития раковых заболеваний. В ходе некоторых исследований было установлено, что между уровнем потребления селена и риском возникновения рака существует обратно пропорциональная зависимость. Так, в экспериментальной группе, ежедневно потреблявшей 200 мкг селена, отмечено 37%-ное снижение заболеваемости раком по сравнению с группой, использовавшей плацебо [17]. Следует отметить, что для взрослых мужчин доза 200 мкг почти в 4 раза превышает рекомендуемую норму потребления селена (55 мкг).

Имеются также данные, свидетельствующие об обратной зависимости числа страдающих коронарной болезнью сердца от содержания селена в крови. Хотя эта зависимость имеет биологическую основу (некоторые селенопротеины являются антиоксидантами, способными предотвращать развитие атеросклероза, вызываемое свободными радикалами), ее пока нельзя считать доказанной [3].

Основными источниками селена в питании являются продукты из злаков, мясо и морепродукты [2]. Содержание Se в них весьма различно и зависит от концентрации этого элемента в почвах данного региона. Показательным примером может служить пшеница. В зерне пшеницы, выращенной в Северной и Южной Дакоте (США), может содержаться более 2 мг селена/кг, а в выращенной в Новой Зеландии — лишь 0,005 мг/кг. То же относится и к продуктам из животного сырья, поскольку состав кормов для животных зависит от состава почвы. В последние десятилетия все большее распространение получает обогащение кормов добавками селена. Это уменьшает зависимость количества селена в продуктах животного происхождения от места их производства [20]. Содержание селена в некоторых продуктах из разных стран приведено в табл. 8.8. Это содержание весьма различно, и поэтому неудивительно, что потребление Se также неодинаково (см. табл. 8.9).

Таблица 8.8
Содержание селена в некоторых видах продуктов, мкг/г. По [20]

Продукты	США	Финляндия[a]		Районы Китая[b]		
		До 1984 г.	После 1984 г.	С низкой концентрацией Se	Со средней концентрацией Se	С высокой концентрацией Se
Злаковые	0,06–0,66	0,005–0,12	0,01–0,27	0,005–0,02	0,017–0,11	1,06–6,9
Из красного мяса	0,08–0,50	0,05–0,10	0,27–0,91	0,01–0,03	0,05–0,25	
Молочные	0,01–0,26	0,01–0,09	0,01–0,25	0,002–0,01	0,01–0,03	
Рыба	0,13–1,48	0,18–0,98	—	0,03–0,20	0,10–0,60	—

[a] Использование Se-содержащих удобрений для повышения содержания Se в продуктах началось в Финляндии в 1984 г.

[b] В Китае есть районы с низким, средним и высоким содержанием Se в почве.

Таблица 8.9
Потребление селена в различных странах. По [91]

Страна или регион	Потребление селена, мкг/сут
Китай (районы с низким содержанием Se в почве)	3–11
Китай (районы с высоким содержанием Se в почве)	3200–6690
Финляндия, 1974 г.	25–60
Финляндия, 1992 г.	90 (в среднем)
Новая Зеландия	6–70
Великобритания, 1978 г.	60 (в среднем)
Великобритания, 1995 г.	29–39
США	62–216

Интересно, что потребление селена в Великобритании с 1978 по 1995 гг. заметно снизилось, очевидно, вследствие снижения доли продуктов, полученных из американской пшеницы [91] (большая часть ее содержит значительные количества селена).

8.3.6. Токсикология тяжелых металлов, присутствующих в пище

Все металлы, включая необходимые для жизни, при превышении безопасного уровня являются токсичными. Особую опасность представляют ртуть, свинец и кадмий.

Тяжелые металлы могут попадать в пищу разными путями. Они могут поступать из почвы через корневую систему или из воздуха или аэрозолей на листья растений. Животные, потребляющие загрязненные растения, воду или других животных, аккумулируют металлы в своих тканях. Загрязненная вода может использоваться для ирригации, в пищевой промышленности или при домашнем приготовлении пищи. Машины и аппараты, применяющиеся в пищевой промышленности, упаковочные материалы также могут содержать тяжелые металлы и загрязнять продукты. Примеси тяжелых металлов поступают в пищу как из природных источников, так и в результате человеческой деятельности. Дожди вымывают тяжелые металлы из горных пород и доставляют их в усвояемой форме в почву. Вулканические породы часто содержат большие количества ртути. К созданным человеком источникам тяжелых металлов относятся удобрения, фунгициды, различные стоки, припои, клеи, использующиеся в керамической промышленности, красители, загрязнения от использования содержащего свинец бензина, выбросы электростанций, другие промышленные отходы, в частности, отходы целлюлозно-бумажных комбинатов. Следует отметить, что в последние 30–40 лет удалось значительно снизить уровень загрязнения окружающей среды. Так, во многих странах сейчас используется бензин, не содержащий свинца, разработаны эффективные способы очистки газовых выбросов и сточных вод, а ртуть- и свинецсодержащие фунгициды и пестициды заменены на более безопасные. Несмотря на это, загрязнение пищевых продуктов тяжелыми металлами продолжает оставаться серьезной проблемой, требующей постоянного внимания.

При получении пищевых продуктов примеси тяжелых металлов можно удалить или, наоборот, ввести. Так, отношение концентраций кадмия в макаронных изделиях из пшеницы дурум и в исходном зерне составляет 0,63 1, а свинца — 1,2 : 1 [23].

Варка макаронных изделий в воде позволяет снизить концентрации кадмия и свинца до соответственно 33 и 52% от концентрации этих металлов в зерне. Отметим, что содержание кадмия и свинца в образцах свежей пшеницы было намного ниже максимально допустимого уровня (0,2 мкг/г), принятого Еврокомиссией в 2001 г.

8.3.6.1. Свинец

Свинец играет роль нейротоксина, способного вызвать серьезное и необратимое ухудшение здоровья. Особенно чувствительны к свинцу дети, однако этот нейротоксин поражает и взрослых людей. К симптомам отравления детей свинцом относятся проблемы в обучении и поведении, анемия, поражение почек и (в серьезных случаях) припадки и кома (вплоть до летального исхода) [33]. Американские Центры кон-

троля заболеваемости (*U.S. Centers for Disease Control*) и Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) считают опасной для детей концентрацию свинца в крови 100 мкг/л.

Благодаря мерам американского правительства риск заражения свинцом в США в последние 20 лет заметно снизился. В 1978 г. было запрещено использование свинца в красках, а использование добавок свинца к бензину полностью запрещено в 1995 г. после 25-летней подготовительной работы. В 1991 г. американские производители добровольно перестали использовать в производстве консервных банок припои, содержащие свинец. Кроме того, американское Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*FDA*) в 1995 г. запретило фасовать пищевые продукты в банки со свинцовым припоем, установив единые правила для американских и импортных продуктов [33]. Все эти меры позволили получить впечатляющие результаты. Так, проведенное *FDA* исследование пищевых рационов показало, что ежедневное потребление свинца 2–5-летними детьми и взрослыми снизилось соответственно с 30 и 38 мкг в 1982–1984 гг. до 1,3 и 2,5 мкг в 1994–1996 гг.

Существенно уменьшилось и содержание свинца в крови американцев, однако специалисты Американских центров контроля заболеваемости на основе анализа данных, полученных в 1999–2001 гг. Национальной службой по контролю здоровья и питания, сообщили, что примерно у 434 тыс. детей в США по-прежнему уровень содержания свинца в крови превышает 100 мкг/л [72]. Из этого следует, что наблюдения следует продолжать — особенно с учетом того факта, что содержание свинца в крови даже менее 100 мкг/л негативно сказывается на показателях умственного развития детей в возрасте 3–5 лет[12].

Исследования усвояемости металлов животными и людьми показали, что в присутствии кальция всасывание свинца в желудочно-кишечном тракте ухудшается. Это навело на мысль, что увеличение потребления кальция может способствовать частичному снижению токсичности свинца. По-видимому, кальций, взаимодействуя с белками эпителиальных клеток кишечника, затрудняет перенос обоих металлов в клетку, однако в работе [7] было показано, что данные, лежащие в основе этой гипотезы, весьма противоречивы, и рекомендуемая норма потребления Са не является основным параметром для объяснения предполагаемого протекторного эффекта кальция.

8.3.6.2. Ртуть

Этот токсичный металл широко распространен в природе. Он присутствует в земной коре, и за счет эрозии и выделения из вулканических пород может попасть в пищу [105]. В виде различных соединений ртуть использовалась при производстве фунгицидов, антибактериальных препаратов, термометров, приборов для измерения артериального давления, электрических выключателей и других товаров. Лишь относительно недавно ртуть была признана токсичным элементом.

8.3.6.2.1. Распространенность и токсичность

Ртуть существует в трех формах: элементной, в виде неорганических солей и органических производных, включая фенил и алкилпроизводные (например, хлорид метилртути CH_3-HgCl и диэтилртуть $(CH_3CH_2)_2Hg$ [1]). Связь Hg-Cl в CH_3-HgCl является ковалентной, что делает это соединение липофильным и поэтому способным проходить через клеточные мембраны [47]. Производные метилртути образуются за счет биометилирования неорганической ртути, присутствующей в донных отложениях озер, рек и океанов [105]. Эти вещества включаются затем в водную пищевую цепь и накапливаются в рыбах и морских млекопитающих. Особенно большая концентрация ртути обнаружена в долгоживущих хищных рыбах — меч-рыбе, акуле, щуке и окуне [18].

Токсичность ртути зависит от типа соединения, в котором она присутствует. Ее наличие приводит к неврологическим и почечным патологиям. Элементная ртуть плохо всасывается и легко выводится из организма, поэтому случаи отравления ею встречаются редко (за исключением хронического воздействия или попадания в организм больших количеств ртути) [27]. В то же время пары ртути токсичны [18], и поэтому применение этого металла во многих приборах, где он прежде использовался (например, в аппарате для измерения артериального давления) запрещено. С другой стороны, соли ртути и ее органические соединения высокотоксичны при низких концентрациях. Производные метилртути были впервые синтезированы в 1960-х гг., при этом два работника получили смертельные отравления [19]. В 1997 г. профессор Дартмутского колледжа умер через 298 дней после того, как он случайно пролил немного метилртути на руку в перчатке [82].

К симптомам поражения почек относятся гломерулонефрит и протеинурия [1], к неврологическим эффектам — паратезия (нечувствительность или покалывание), атаксия (расстройство координации произвольных движений), неврастения (эмоциональные и психологические проблемы), а также потеря зрения и слуха. Возможен даже летальный исход [1].

Известны трагические случаи отравления пищевыми продуктами, содержавшими ртуть. Вспышка пищевых отравлений в японской провинции Минамата была вызвана сильным загрязнением залива и рыбы в нем ртутьсодержащими сточными водами [27, 93]. При вспышке в Ираке зимой 1971–1972 гг. сотни людей отравились хлебом из пшеничной муки, обработанной содержащим метилртуть фунгицидом — посадочные семена по ошибке попали на мукомольное предприятие (из 6000 отравившихся погибли 500 человек). После этого Агентство по защите окружающей среды запретило использование соединений алкилртути в сельском хозяйстве [1]. В настоящее время главным источником метилртути являются гидробионты [18]. Содержание ртути в гидробионтах широко варьирует [35] (табл. 8.10). Хотя наиболее опасна морская рыба, ртуть также может содержаться и в продуктах из речной рыбы. *FDA* особенно предостерегает от потребления таких продуктов беременных женщин [36].

Таблица 8.10
Содержание ртути в некоторых видах гидробионтов. По [36]

Вид гидробионтов	Среднее содержание, мг/кг	Диапазон, мг/кг
Кафельник	1,45	0,65–3,73
Меч-рыба	1,00	0,10–3,22
Королевская макрель	0,73	0,30–1,67
Акула	0,96	0,05–4,54
Тунец (свежий или замороженный)	0,32	Нижний предел не известен–1,30
Омар (североамериканский)	0,31	0,05–1,31
Тунец (консервированный)	0,17	Нижний предел не известен –0,75
Лосось	Не определено	Нижний предел не известен –0,18
Креветки	Не определено	Не определен

8.3.6.3. Кадмий

Хроническое отравление кадмием приводит к заболеваниям почек, костей, некоторым формам рака [57]. Объединенный комитет экспертов по пищевым добавкам (*JECFA*) ФАО/ВОЗ обнародовал величину временного допустимого еженедельного потребления (*PTWI*) кадмия — 7 мкг/кг массы тела (то есть 1 мкг/кг массы тела в сутки). *JECFA* определяет *PTWI* как уровень недельного потребления, безопасный в течение всей жизни без значительного риска для здоровья [97, 98], однако недавно ряд ученых предположили, что риски дисфункции почек высоки и при содержании ниже этого *PTWI* [57, 97].

В природе кадмий встречается в почве, воде и донных отложениях озер, рек и океанов [77]. Исследования, проведенные в Австралии, показали, что содержание Cd в почвах сельскохозяйственного назначения значительно выше, чем в не использующихся для выращивания культурных растений [98]. Причинами этого могут быть как использование фосфатных удобрений, содержащих кадмий, так и влияние сточных вод. Загрязнение почв кадмием весьма опасно, так как он лучше усваивается растениями, чем свинец или ртуть, и поэтому основными источниками поступления кадмия в организм человека являются продукты из растений, выращенных на загрязненных кадмием почвах [98].

Данные о содержании кадмия в различных пищевых продуктах и ежедневном потреблении этих продуктов и кадмия в них приведены в табл. 8.11, откуда видно, что основными источниками кадмия являются овощи и продукты из злаков. Некоторые растения и животные являются бионакопителями кадмия. Например, семена подсолнечника обычно содержат больше кадмия, чем семена и плоды других культур, выращенных на той же почве. Ракообразные и моллюски также аккумулируют кадмий. К счастью, уровень потребления этих «бионакопителей» обычно невелик. По экспертным оценкам, суточное потребление кадмия составляет 30 мкг, что ниже рекомендуемого ФАО/ВОЗ безопасного уровня (70 мкг).

Таблица 8.11

Содержание кадмия в различных видах продуктов и оценка его потребления людьми. По [98]

Пищевые продукты	Содержание кадмия в продуктах, мг/кг		Типичное потребление продукта, г/сут.	Потребление кадмия мкг/сут	
	Максимальное	Типичное		Максимальное	Типичное
Овощи, включая картофель	0,1	0,05	250	25	12,5
Злаки и бобовые	0,2	0,05	200	40	10
Плоды	0,05	0,01	150	7,5	1,5
Семена масличных культур и какао-бобы	1,0	0,5	1	1	0,5
Мясо и птица	0,1	0,02	150	15	3,0
Печень (говяжья, баранья, куриная, свиная)	0,5	1,0	5	2,5	0,5
Почки (говяжьи, бараньи, куриные, свиные)	2,0	0,5	1	2	0,5
Рыба	0,05	0,02	30	1,5	0,6
Ракообразные, моллюски	2	0,25	3	6	0,75
Всего				93,5	30

8.4. Минеральный состав пищевых продуктов

8.4.1. Зола. Определение и значение зольности в анализе пищевых продуктов

Зола рассматривается в справочниках по нутриентам как составная часть пищи. Она представляет собой остаток после полного сжигания пищевого продукта, то есть массу неорганических веществ в образце [45]. Методы определения золы для различных групп пищевых продуктов описаны в литературе [5]. Зола представляет собой смесь оксидов, сульфатов, фосфатов, нитратов и галогенидов металлов. Ее масса существенно превышает массу минеральных веществ в пищевом продукте, так как во многих анионах солей присутствует кислород. Тем не менее, определение массы золы позволяет оценить содержание минеральных веществ в пище и необходимо для расчета общего содержания углеводов.

8.4.2. Отдельные минеральные вещества

Отдельные минеральные вещества определяют после получения золы, ее растворения (обычно в кислоте) и измерения концентрации минеральных веществ в растворе [14, 45, 75] химическими или инструментальными методами. Последние, как правило, являются более точными и быстрыми. С 1960-х гг. для определения концентрации минеральных веществ широко используется атомная абсорбционная спектроскопия. Это весьма надежный метод, позволяющий, однако, измерять в данный момент времени концентрацию только одного элемента. В последние годы весьма популярными стали спектрометры на основе индуктивно связанной плазмы, поскольку они позволяют одновременно определять несколько элементов в одном образце [75]. Концентрации некоторых минеральных элементов приведены в табл. 8.12. Данные для этой таблицы были получены из справочника Министерства сельского хозяйства США по нутриентам, журнальных статей и результатов производственных испытаний. В таблице приведены средние значения, поскольку величины для отдельных видов пищевых продуктов могут существенно отличаться от данных, представленных в табл. 8.12.

8.4.3. Факторы, влияющие на минеральный состав пищевых продуктов

Состав минеральных веществ в пищевых продуктах может меняться, поскольку существует очень много влияющих на него факторов.

Таблица 8.12

Минеральный состав некоторых пищевых продуктов. По [107]

Порция	Пищевой продукт	Масса, г	Энергетическая ценность, ккал	Ca, мг	Fe, мг	Mg, мг	P, мг	K, мг	Na, мг	Zn, мг	Cu, мг	Se, мкг
				на порцию								
1 крупное яйцо	Яичница	61	102	43	0,73	7	104	84	171	0,61	0,009	13,7
1 ломтик	Белый хлеб	25	66	38	0,94	6	25	25	170	0,2	0,063	4,3
1 ломтик	Цельнозерновой пшеничный хлеб	28	69	30	0,68	23	57	69	132	0,5	0,106	11,3
0,5 чашки	Спагетти, приготовленные без соли	70	111	5	0,9	13	41	31	1	0,36	0,07	18,5
0,5 чашки	Длиннозерный бурый рис, отваренный	98	108	10	0,41	42	81	42	5	0,61	0,098	9,6
0,5 чашки	Среднезерный белый рис, отваренный	93	121	3	1,39	12	34	27	0	0,39	0,035	7
0,5 чашки	Черная фасоль, приготовленная без соли	86	114	23	1,81	60	120	305		0,96	0,18	1
0,5 чашки	Красная фасоль, приготовленная без соли	89	112	25	2,6	40	126	357	2	0,95	0,214	1,1
1 чашка	Цельное молоко	244	146	276	0,07	24	222	349	98	0,98	0,027	9
1 чашка	Обезжиренное и маложирное молоко	247	86	504	0,1	27	249	410	128	0,99	0,027	5,2
1,5 унции	Американский сыр	42	76	287	0,18	10	347	76	601	1,39	0,014	7
1,5 чашки	Сыр Чеддер	113	455	815	0,77	32	579	111	702	3,51	0,035	15,7
0,5 чашки	Сыр коттедж, сливочный (творог)	113	116	68	0,16	6	148	94	456	0,42	0,032	10,1
1 чашки	Йогурт с пониженным содержанием жира, обычный	245	154	448	0,2	42	353	573	172	2,18	0,032	8,1
0,5 чашки	Мороженое ванильное	72	145	92	0,06	10	76	143	58	0,5	0,017	1,3
1 шт	Печеный картофель в мундире	173	161	26	1,87	48	121	926	17	0,62	0,204	0,7
1 шт	Очищенный вареный картофель	167	144	13	0,52	33	67	548	8	0,45	0,279	0,5
3 шт	Брокколи, свежая	93	32	44	0,68	20	61	294	31	0,38	0,046	2,3
3 шт	Брокколи, приготовленная из свежей	111	39	44	0,74	23	74	325	46	0,5	0,068	1,8
0,5 чашки	Морковь сырая протертая	55	23	18	0,17	7	19	176	38	0,13	0,025	0,1
0,5 чашки	Морковь, отваренная из замороженной	73	27	26	0,39	8	23	140	43	0,26	0,06	0,4

Таблица 8.12 (окончание)

Порция	Пищевой продукт	Масса, г	Энергетическая ценность, ккал[1]	Ca, мг	Fe, мг	Mg, мг	P, мг	K, мг	Na, мг	Zn, мг	Cu, мг	Se, мкг
				на порцию								
1 шт	Томаты свежие	123	22	12	0,33	14	30	292	6	0,21	0,073	0
0,75 чашки	Томатный сок, консервированный	182	31	18	0,78	20	33	417	18	0,27	0,111	0,5
0,75 чашки	Апельсиновый сок, восстановленный из замороженного сока	187	84	17	0,19	19	30	355	2	0,09	0,082	0,2
1 шт	Апельсин	131	62	52	0,13	13	18	237	0	0,09	0,059	0,7
1 шт	Яблоко с кожурой	138	72	8	0,17	7	15	148	1	0,06	0,037	0
1 шт	Банан очищенный	118	105	6	0,31	32	26	422	1	0,18	0,092	1,2
3 унции	Говядина жареная	85	185	5	1,84	14	139	182	30	3,77	0,054	22,9
3 унции	Телятина жареная	85	136	5	0,77	24	199	331	58	2,58	0,11	9,5
3 унции	Белое куриное мясо, жареное	85	130	11	0,92	20	184	201	43	0,66	0,036	21,9
3 унции	Красное куриное мясо, жареное	85	151	9	1,13	17	145	190	81	1,81	0,06	16,7
3унции	Лосось, приготовленный	85	127	14	0,84	28	251	352	73	0,6	0,084	48,6
3 унции	Лосось консервированный с костями	85	118	181	0,71	29	280	277	64	0,78	0,087	28,2

8.4.3.1. Факторы, влияющие на минеральный состав пищевых продуктов растительного происхождения

Для роста растений необходимо присутствие в почве воды и ряда минеральных веществ. Из корней нутриенты поступают в другие части растения. Конечный состав съедобных частей растения зависит от вида растения, плодородности почв и условий окружающей среды (рис. 8.14). В последние годы было показано, что содержание микроэлементов в зернах злаковых и бобовых культурах существенно варьирует (табл. 8.13).

Таблица 8.13

Содержание железа и цинка (на сухое вещество) в различных генотипах риса, пшеницы и фасоли. По [113]

Культура	Fe, мкг/г		Zn, мкг/г	
	Среднее	Диапазон	Среднее	Диапазон
Бурый рис	13	9–23	24	13–12
Пшеница	37	29–57	35	25–53
Фасоль	55	34–89	35	21–54

8.4.3.2. Значение растительной пищи для удовлетворения потребности человека в минеральных веществах

Пищевые продукты растительного происхождения являются основным источником нутриентов для большей части населения нашей планеты, и поэтому очень важно понять, насколько они удовлетворяют потребности человека и каким образом можно повысить их пищевую ценность. В связи с этим возникает целый ряд вопросов, на которые необходимо получить ответы. Нуждаются ли растения и люди в одних и тех же минеральных нутриентах? Является ли концентрация минеральных нутриентов в растениях до-

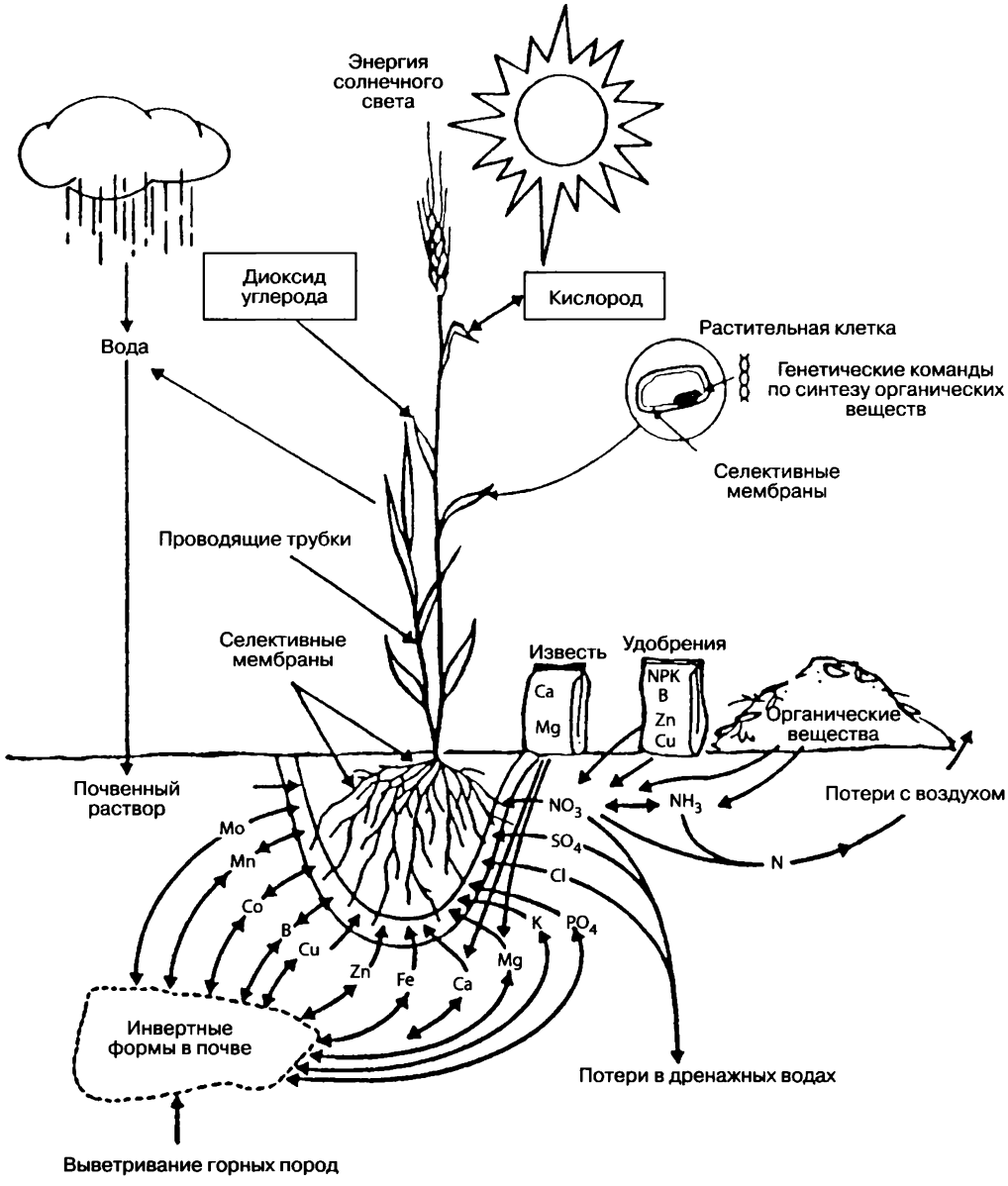


Рис. 8.14. Растение получает нутриенты из окружающей корни почвы. Источниками этих нутриентов являются удобрения, разлагающиеся органические вещества, горные породы. Минеральные вещества поступают через корни во все части растения. Процесс усвоения осуществляется в соответствии с программой, закодированной в геноме растения. По [2]

статочной, чтобы обеспечить потребности человека? Можно ли для повышения пищевой ценности изменять концентрации минеральных веществ в растениях агротехническими или генетическими способами? Обладают ли растения, выросшие на истощенных почвах, худшими нутритивными свойствами по сравнению с растениями, выросшими на плодородных почвах?

Список эссенциальных для растений минеральных элементов сходен, но не идентичен их набору для человека. Для человека, например, необходимы фтор, селен и йод, но большинству растений они не нужны. Следовательно, можно ожидать дефицита этих элементов у тех групп населения, рацион которых в значительной степени состоит из пищевых продуктов растительного происхождения, выращенных на почвах с низкой концентрацией F, Se и I, что и подтверждается результатами исследований [20, 26].

Если те или иные нутриенты необходимы и растениям, и животным, то можно было бы ожидать уменьшения дефицита минеральных элементов, поскольку они неизбежно будут присутствовать в растениях. Увы, содержание минеральных элементов в растениях иногда слишком мало, чтобы удовлетворять потребности человека, или эти элементы находятся в не усваиваемой человеком форме (см. разделы 8.3.5.1 и 8.3.5.4).

Особенно это относится к кальцию и железу. Содержание Ca в некоторых растениях чрезвычайно мало. В рисе, например, на 100 ккал энергетической ценности приходится лишь 10 мг кальция. Таким образом, люди, потребляющие много риса, должны включать в рацион другие продукты, содержащие кальций. Железо более равномерно распределено в продуктах растительного происхождения, однако его усвояемость при потреблении продуктов из злаковых и бобовых культур очень мала.

Хотя в некоторых случаях повысить пищевую ценность продуктов растительного происхождения можно агрономическими приемами, сделать это достаточно трудно, поскольку поступление минеральных веществ из почвы в растения, а из растений — в организм животных или человека представляет собой чрезвычайно сложный процесс. Почвы весьма разнообразны по своему минеральному составу. Кроме того, концентрация того или иного элемента в почве не всегда может служить показателем того, какое его количество поглощено корнями, поскольку на усвояемость этого элемента растениями существенно влияют форма, в которой данный элемент присутствует в почве, и ее значение pH. Так, повышение pH почвы за счет известкования снижает усвояемость растениями железа, цинка, марганца и никеля и повышает усвояемость молибдена и селена [114]. Кроме того, растения обладают физиологическими механизмами регулирования количества поглощенных из почвы нутриентов, так что попытки улучшить минеральный состав пищевого сырья могут не привести к положительному результату. Например, использование удобрений не дает увеличения содержания в растениях железа, марганца или кальция [114]. С другой стороны, установлено, что применение удобрений, содержащих цинк в превышающих необходимые для растений количествах, увеличивает содержание цинка в горохе [115]. Появляется также все больше данных, свидетельствующих, что основную роль в составе минеральных элементов в растениях играют генетические факторы, и что вариации между разными генотипами могут быть весьма велики [113]. Следовательно, содержание минеральных элементов в продуктах растительного происхождения можно повысить, используя широко используемый в селекции растений метод, называемый «биообогащением» или «биофортификацией»

8.4.3.3. Факторы, влияющие на минеральный состав пищевых продуктов животного происхождения

Содержание минеральных веществ в пищевых продуктах животного происхождения изменяется в более узком диапазоне, чем в продуктах растительного происхождения. Как правило, изменения в рационе кормления животных оказывают незначительное влияние на содержание минеральных элементов в мясе, молоке и яйцах благодаря механизмам гомеостаза, регулирующим содержание необходимых нутриентов в тканях. Исключением является значительно меньшее содержание железа в телятине по сравнению с говядиной, что объясняется в основном молочным рационом телят с небольшим содержанием железа, тогда как основную часть рациона убойных животных составляют относительно богатые железом злаковые и бобовые культуры. Так, в 100 г тушеной маложирной телятины содержание железа составляет 1,32 мг, а в 100 г тушеной говядины — 3,32 мг [107].

8.4.3.4. Значение животной пищи для удовлетворения потребности человека в минеральных веществах

Ткани животных и человека близки по составу, и поэтому можно ожидать, что продукты животного происхождения будут хорошим источником нутриентов. Что касается железа, цинка, фосфора и кобальта (в виде витамина B_{12}) это действительно так, однако в мясе, рыбе и мясе птицы довольно мало кальция. Содержание йода в этих продуктах (за исключением морской рыбы) также невелико. Отличным источником кальция являются молочные продукты. Таким образом, можно сделать вывод, что адекватное потребление всех эссенциальных минеральных элементов обеспечивается путем потребления различных продуктов и животного, и растительного происхождения.

8.4.4. Обогащение пищевых продуктов минеральными веществами

В США обогащение пищевых продуктов ведет свое начало с 1924 г., когда для предотвращения базедовой болезни (серьезной проблемы в те годы) начали йодировать соль [13]. В начале 1940-х гг. обогащение стали применять шире, поскольку обнаружилось, что многие молодые люди из-за плохого питания были неспособны выполнить армейские нормативы. В 1943 г. обогащение хлебопекарной муки железом (а также рибофлавином, тиамином и ниацином) стало обязательным. Обогащение пищевых продуктов витамином D началось в 1933 г., а фолиевой кислотой — в 1998 г. [6].

Практика обогащения пищевых продуктов в США за нескольких десятков лет позволила существенно снизить дефицит железа, йода, ниацина и витамина D, а также уровень заболеваемости болезнями, связанными с их дефицитом. Употребление в пищу обогащенных продуктов в настоящее время является одной из главных причин низкой распространенности дефицита микронутриентов в США. Так, число детей, больных анемией, в США начиная с 1970 г. неуклонно снижается [121], что хорошо коррелирует с увеличением количества и улучшением качества обогащенных железом смесей для новорожденных, а также зерновых продуктов, что еще раз доказывает важность обогащения. Примером страны, в которой выполняется национальная программа обогащения железом молока, может служить Чили, где благодаря этой программе удалось резко снизить дефицит железа у детей [121].

В настоящее время в США многие продукты из очищенного зерна (мука, рис, продукты из кукурузы) обогащают железом, ниацином, рибофлавином, тиамином и фолиевой кислотой. Действующие нормы *FDA* США по обогащенным муке, хлебобулочным изделиям, рису, кукурузе и макаронным изделиям приведены в табл. 8.14 [37]. Большая часть используемой в домашнем хозяйстве соли является йодированной. Применяется также обогащение зерновых завтраков кальцием, цинком и другими микроэлементами. Наибольшее количество добавленных минеральных веществ содержится в смесях для детского питания, которые призваны полностью удовлетворять пищевые потребности детей.

Таблица 8.14
Нормы *FDA* США по обогащению зерновых продуктов железом и кальцием [37]

Обогащенный зерновой продукт	Должно содержаться железа, мг/фунт	Может содержаться кальция, мг/фунт
Мука [a]	20	960
Хлебобулочные изделия [a]	12,5	600
Макаронные изделия [b]	Не менее 13	Не менее 500
	Не более 16,5	Не более 625
Рис [b]	Не менее 13	Не менее 500
	Не более 26	Не более 1000
Изделия из кукурузы [b]	Не менее 13	Не менее 500
	Не более 26	Не более 750

[a] Источником обогащающего микроэлемента может быть любое безопасное и доступное вещество.
[b] Железо и/или кальций должны поступать из безопасного и усваиваемого источника.
Примечание. Этим нормам должны соответствовать все пищевые продукты, маркируемые и этикетируемые как «обогащенные».

8.4.4.1. Железо

Широкое обогащение пищевых продуктов железом в США началось в 1943 г. во время Второй мировой войны, когда вступил в силу Приказ по продуктам для армии № 1, согласно которому вся отбеленная мука, реализуемая в торговле между штатами, должна была быть обогащенной. По действующему федеральному законодательству это уже не обязательно, однако законы многих штатов по-прежнему содержат это требование.

Добавление железа к пищевым продуктам должно тщательно контролироваться, поскольку некоторые его формы катализируют окисление ненасыщенных жирных кислот, а также витаминов A, C и E [73]. Эта и другие реакции с участием железа могут привести к нежелательным изменениям цвета, вкуса и/или аромата продукта. Во многих случаях наиболее усвояемая форма железа одновременно является и наи-

более каталитически активной, и наоборот. Чем более растворимо в воде соединение железа, тем выше его усвояемость и способность к ухудшению органолептических свойств продукта. Некоторые наиболее часто используемые в целях обогащения соединения железа и их свойства приведены в табл. 8.15.

Таблица 8.15

Характеристики некоторых соединений железа, используемых для обогащения пищевых продуктов. По [10, 34, 40, 53, 73]

Химическое название	Формула и молекулярная масса (атомный вес)	Содержание железа в соединении, г/кг	Растворимость	Относительная усвояемость, %[a]
Сульфат железа (II)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Мол. масса 278	200	Растворим в H_2O и разбавленной HCl	100
Глюконат железа (II)	$FeC_{12}H_{22}O_{14} \cdot H_2O$ Мол. масса 482	116	То же	89
Фумарат железа (II)	$FeC_4H_2O_4$ Мол. масса 170	330	" —	27–200
Пирофосфат железа (III)	$Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot H_2O$ Мол. масса 745	240	Нерастворим в H_2O, Растворим в разб. HCl	21–74
Пирофосфат железа (III), микронизированные частицы	$Fe_4(P_2O_7)_3 \cdot H_2O$ Мол. масса 745	240	Диспергируется в воде	100
Бис-глицинат железа (II)	$FeC_4H_8O_4 \cdot H_2O$ Мол. масса 240	230	Растворим в H_2O и разбавленной HCl	90–350
Этилендиаминтетраацетат железа (III), натриевая соль	$FeNaC_{10}H_{12}N_2O_8 \cdot 3H_2O$ Мол. масса 421	130	То же	30–390
Электролитическое железо, порошок	Fe Атомный вес 56	970	Нерастворимо в H_2O, растворимо в разбавленной HCl	75
Восстановленный водородом порошок железа	Fe Атомный вес 56	97	То же	13–148
Карбонил железа, порошок	Fe Атомный вес 56	99	" —	5–20

[a] Относительно $FeSO_4$, усвояемость которого принята за 100%.

Одним из наиболее дешевых источников железа является сульфат двухвалентного железа. Он используется в качестве стандарта усвояемости, так как относительно хорошо усваивается в составе многих пищевых продуктов (табл. 8.15), однако имеются данные, что у некоторых хлебобулочных изделий из муки, обогащенной $FeSO_4$, через некоторое время появляются неприятные вкус и запах [8]. В работе [8] приведены следующие рекомендации, выполнение которых позволит предотвратить появление нежелательных эффектов, связанных с использованием сульфата железа (II):

- $FeSO_4$ является предпочтительным источником железа при обогащении хлебобулочных изделий;
  сульфат железа (II) может использоваться для обогащения пшеничной муки, если концентрация железа не превышает 40 мг/кг, а мука хранится при умеренных температуре и влажности не более 3 мес.
  сульфат железа (II) нельзя использовать для обогащения муки длительного хранения (например, в домашнем хозяйстве) и муки, используемой в смеси с жирами, маслами и другими легко окисляющимися ингредиентами;
  запрещается использовать концентрированные премиксы пшеничной муки и сульфата железа (II), поскольку премикс может прогоркнуть.

Если применение сульфата железа приводит к нежелательным последствиям, лучше использовать другие источники железа. Так, в последние годы при обогащении муки, предназначенной для домашнего

приготовления пищи, зерновых завтраков и детского питания применяют порошок элементарного железа. Все эти продукты имеют длительный срок годности.

Порошок элементарного железа состоит из мелких металлических частиц и представляет собой почти чистое железо с небольшими примесями других металлов и оксидов железа. Элементарное железо нерастворимо в воде, и поэтому перед всасыванием в кишечнике оно должно перейти в окисленное состояние. По-видимому, это окисление протекает в желудке при взаимодействии железа с кислотой:

$$Fe^0 + 2H^+ \rightarrow Fe^{2+} + H_2$$

Возможна также реакция железа с кислородом в кислой среде:

$$2Fe^0 + O_2 + 4H^+ \rightarrow 2Fe^{2+} + 2H_2O$$

Эта реакция протекает в ходе приготовления пищевых продуктов, например, при выпечке хлебобулочных изделий. Существует три вида порошкообразного железа [83].

Восстановленное железо. Эту форму получают восстановлением оксида железа водородом или монооксидом углерода с последующим размолом железа на мельнице. Это наименее чистый порошок, чистота которого зависит прежде всего от чистоты используемого оксида железа [83].

Электролитическое железо. Этот порошок получают на катоде электролизера, представляющем собой гибкие листы из нержавеющей стали. Осадок железа удаляется со стальных листов и поступает на мельницу, где получают тонкий порошок. Чистота электролитического железа выше, чем восстановленного. Основной примесью является оксид железа, образующийся при измельчении и хранении [83].

Карбонильное железо. Данная форма образуется при нагревании железного лома или восстановленного железа в атмосфере CO при высоком давлении. Продуктом реакции Fe и CO является пентакарбонил железа $Fe(CO)_5$, который при высокой температуре разлагается с образованием очень чистого мелкодисперсного железа [83].

Порошки элементарного железа весьма стабильны и, по-видимому, не катализируют окисление пищевых продуктов, однако усвояемость этих порошков весьма различна и зависит прежде всего от размера частиц металла. Порошки имеют темно-серый цвет и могут вызывать небольшое потемнение отбеленной муки, но серьезной проблемы это не представляет [8].

Относительно недавно возрос интерес к хелатной форме железа — натриевой соли этилендиаминтетраацетата железа [NaFe(III)ЭДТА] [117]. Опыты на крысах показали, что из этого хелатного комплекса железо усваивается практически так же, как и из $FeSO_4$ [29]. Установлено также, что в присутствии ингибиторов железо из [NaFe(III)ЭДТА] усваивается человеком лучше, чем из $FeSO_4$ [10, 56]. ЭДТА образует с Fe(III) и Fe(II) более прочные комплексы, чем лимонная кислота и полифенолы [51, 101]. Это приводит к тому, что железо практически не связывается ингибиторами. В их отсутствие усвояемость железа из [NaFe(III) ЭДТА] может быть ниже, чем из $FeSO_4$ (см. табл. 8.15). В ходе недавних исследованиях во Вьетнаме было показано [110], что распространенность дефицита железа у женщин, потреблявших течение 6 мес. рыбный соус, обогащенный [NaFe(III)ЭДТА], оказалась на 50% ниже, чем у женщин, употреблявших необогащенный соус. В аналогичных исследованиях в Китае было показано, что введение в рацион соевого соуса, обогащенного [NaFe(III)ЭДТА], значительно снижает анемию у мужчин, женщин и детей [15].

Весьма перспективно также использование хелатов железа с аминокислотами [53]. Наиболее изучен *бис*-глицинат железа (II), в котором соотношение металл : аминокислота составляет 1 2. Этот комплекс менее подвержен действию ингибиторов, чем сульфат железа (II). Очевидно, *бис*-глицинат железа (II) наиболее перспективен для использования в рационе на основе цельнозерновых продуктов. Основной недостаток *бис*-глицината железа (II) и других хелатных комплексов с аминокислотами состоит в том, что они дороже $FeSO_4$ и порошкообразного элементарного железа [53].

8.4.4.2. Цинк

Учитывая широкую распространенность дефицита цинка в организме, многие специалисты по питанию призывают шире использовать обогащение пищевых продуктов этим элементом. В США статус *GRAS*

(*Generally Recognized as Safe,* признаны практически безопасными) получили пять соединений цинка — сульфат, хлорид, глюконат, оксид и стеарат [94]. Для обогащения пищевых продуктов чаще используют оксид цинка, который наиболее стабилен (по-видимому, благодаря низкой растворимости). Тем не менее, его усвояемость эквивалентна усвояемости более растворимого сульфата цинка — так, всасываемость Zn из ZnO и $ZnSO_4$, которыми обогащали кукурузные лепешки, составила соответственно 36,8 и 37,2% [94]. Следует также отметить, что обогащение пшеничной муки $ZnSO_4$ снижает усвояемость железа детьми 4–8 лет, но Zn из оксида не оказывает влияния на всасывание железа [52]. В работе [94] рекомендуется в Мексике обогащать цинком кукурузную муку до его содержания 20–50 мг/кг.

8.4.4.3. Йод

Как мы уже отмечали, программа по йодированию соли была принята в США в 1924 г. Несмотря на относительную простоту технологии и общепризнанный успех этой программы в США и других развитых странах, во многих развивающихся странах йодирование соли не осуществлялось даже 10 лет назад, и дефицит йода все еще распространен. К счастью, ВОЗ в 1993 г. одобрила программу действий *USI* (*Universal Salt Iodization*), согласно которой вся соль, предназначенная для питания человека и животных, а также используемая в пищевой промышленности, должна йодироваться [25]. Число стран, где соль йодируется, возросло с 43 в 1993 г. до 93 в 2003 г. в результате чего существенно снизилось число людей с заболеваниями зоба и задержками умственного развития [118]. Увы, дефицит йода по-прежнему остается серьезной проблемой во многих регионах земного шара, в том числе из-за использования в пищу нейодированной соли.

Для обогащения соли применяют йодид натрия (NaI) и йодат натрия ($NaIO_3$). Зачастую более предпочтительным является йодат, более стабильный при хранении, чем йодид, особенно при высоких влажности и температуре [25].

8.4.5. Технологические аспекты

В отличие от витаминов и аминокислот, минеральные вещества не разлагаются при воздействии высоких температур, окислителей, кислот и щелочей и других факторов, влияющих на органические соединения. Вместе с тем они могут быть удалены из пищевых продуктов за счет выщелачивания или физического разделения. Кроме того, на усвояемость минеральных веществ влияют различные факторы (см. раздел 8.3.3).

Наиболее важным фактором, приводящим к потерям минеральных веществ, является размол зерна, поскольку наиболее богаты этими элементами оболочка и зародыш. При их удалении получают чистый эндосперм, содержание в котором минеральных веществ относительно невелико (данные по их содержанию в различных частях зерна приведены в табл. 8.16). Аналогичные потери наблюдаются при переработке риса и других злаковых культур. В США муку и продукты из муки обогащают только железом.

На сохранность кальция в сыре большое влияние оказывают условия его производства. В сырах с низким значением pH при удалении сыворотки наблюдаются значительные потери кальция. Содержание кальция и фосфатов в различных сырах приведено в табл. 8.17 (в мг/100 г сыра и в виде отношения к белку. Последняя величина служит хорошим показателем потерь кальция, поскольку содержание воды

Таблица 8.16
Содержание микроэлементов в пшенице и некоторых продуктах ее переработки, мг/кг

Элемент	Цельное зерно пшеницы	Отбеленная пшеничная мука	Зародыш	Отруби	Потери при производстве муки, %
Fe	43	10,5	67	47–78	76
Zn	35	8	101	54–130	78
Mn	46	6,5	137	64–119	86
Cu	5	2	7	7–17	68
Se	0,6	0,5	1,1	0,5–0,8	16

Источник. Handbook of Nutritive Value Processed Food / M. Rechcigl, Jr. (ed.). — 3rd ed. —Vol. I. — Boca Raton, FL: CRC Press. 1982. — P. 521–528.

Таблица 8.17
Содержание белка, кальция и фосфатов в некоторых сырах. По [44, 64]

Сыр	Белок, %	Ca, мг/100 г	Ca : белок, мг : г	PO_4, мг/100 г	PO_4 : белок, мг : г
Коттедж	15,2	80	5,4	90	16,7
Чеддер	25,4	800	31,5	860	27,3
Эмменталь	27,9	920	33,1	980	29,6

в сырах зависит от их сорта. Так, в сыре «коттедж» содержание кальция минимально, поскольку удаление сыворотки проходит при значении pH < 5 [44]. В производстве же сыров чеддер и эмменталь сыворотку удаляют обычно при значениях pH 6,1 и 6,5 соответственно, а коллоидный фосфат кальция (основное соединение кальция в молоке) лучше растворим в кислых растворах. Низкое содержание кальция в сыре «коттедж» объясняется именно потерями кальция с кислой сывороткой [64].

Поскольку многие минеральные вещества хорошо растворимы в воде, можно предполагать, что кулинарная обработка продуктов с использованием воды может оказать существенное влияние на потери этих соединений. К сожалению, данных о таких потерях очень мало. Известно, в частности, что при варке овощи теряют больше минеральных веществ, чем при обработке паром [60]. Потери железа при приготовлении макаронных изделий минимальны, но для калия они составляют более 50% [60], что объясняется присутствием калия в пищевых продуктах в виде свободного иона, а железо связано с белками и другими высоко- и низкомолекулярными лигандами пищевых продуктов.

8.5. Химические и функциональные свойства минеральных веществ в пищевых продуктах

Хотя массовые доли минеральных веществ в пищевых продуктах сравнительно малы, зачастую они оказывают большое влияние на физические и химические свойства пищевых продуктов, поскольку реагируют с другими нутриентами. Взаимодействия минеральных веществ с другими компонентами пищевых продуктов в общем плане рассмотрены в других главах, и соответствующие данные сведены в табл. 8.18. Далее мы рассмотрим некоторые функциональные свойства минеральных веществ.

Таблица 8.18
Функции минеральных элементов, их солей и комплексов в пищевых продуктах

Минеральное вещество	Пищевой источник	Функциональное назначение
Алюминий (Al)	Концентрация в пищевых продуктах мала, главными источниками являются пищевые добавки (разрыхлители, красители). Вклад в потребление вносят также эндогенный Al в продуктах растительного происхождения и примеси от алюминиевой посуды	*Разрыхлитель*: в виде $(Na_2SO_4 \cdot Al_2(SO_4)_3)$ *Краситель*: алюминиевые лаки пищевых красителей *Эмульгатор:* $Na_3Al(PO_4)_2$ в сырах
Бром (Br)	Мука, обогащенная бромом	*Улучшитель хлебопекарный:* бромат калия улучшает хлебопекарные свойства пшеничной муки. В США в основном заменяется аскорбиновой кислотой
Кальций (Ca)	Молочные продукты, зеленые листовые овощи, тофу, рыбные кости, продукты, обогащенные кальцием	*Модификатор текстуры:* образует гели с отрицательно заряженными макромолекулами — альгинатами, низкомолекулярными метоксилированными пектинами, соевыми белками, казеинами и т. д. Повышает вязкость растворов альгинатов. При добавлении к рассолу уплотняет текстуру консервированных овощей

Таблица 8.18 (окончание)

Минеральное вещество	Пищевой источник	Функциональное назначение
Медь (Cu)	Мясные субпродукты (печень, сердце и др.), морепродукты, орехи, семена	*Катализирует:* окисление липидов, аскорбиновой кислоты, неферментативное окислительное потемнение *Модификатор цвета*: может вызывать потемнение консервированных мясных продуктов *Кофактор* в полифенолоксидазе *Стабилизатор текстуры:* стабилизирует пену яичного белка
Йод (I)	Йодированная соль, морепродукты, растительное и животное сырье из зон со значительным содержанием йода в почве	*Улучшитель теста:* йодат калия улучшает хлебопекарные свойства пшеничной муки
Железо (Fe)	Злаковые и бобовые культуры, мясо, примеси от железной посуды и из почвы, пищевые продукты, обогащенные железом	Fe^{2+} и Fe^{3+} *катализируют* окисление липидов *Модификатор цвета*: цвет свежего мяса зависит от валентности Fe в миоглобине и гемоглобине: Fe^{2+} дает красный цвет, а Fe^{3+} — коричневый. Образует комплексы с полифенольными соединениями зеленого, синего или черного цвета. В консервированных продуктах реагирует с S^{2-}, образует FeS черного цвета *Кофактор* в липоксигеназе, цитохромах, рибонуклеотидредуктазе и т. д.
Магний (Mg)	Цельное зерно, орехи, бобовые, зеленые листовые овощи	*Модификатор цвета:* удаление Mg из хлорофилла изменяет цвет с зеленого на оливково-коричневый
Марганец (Mn)	Цельное зерно, фрукты, овощи	Mn является *кофактором* в пируваткарбоксилазе и супероксиддисмутазе
Никель (Ni)	Пищевые продукты растительного происхождения	Ni — наиболее часто используемый *катализатор* гидрогенизации растительных масел
Фосфаты	Распространены повсеместно, наилучший источник — продукты животного происхождения. Широко используются как пищевые добавки	*Подкислитель:* H_3PO_4 в безалкогольных напитках *Быстродействующий разрыхлитель*: $Ca(H_2PO_4)_2$. Триполифосфат натрия улучшает ВУС консервированного мяса. Фосфаты используют для улучшения эмульгирования измельченного мяса и сыра
Калий (K)	Фрукты, овощи, мясо	KCl используется как заменитель поваренной соли. Может вызвать горький привкус *Разрыхлитель:* кислый тартрат калия
Селен (Se)	Море- и субпродукты, зерновые (содержание зависит от состава почвы)	*Кофактор* в глутатионпероксидазе
Натрий (Na)	Поваренная соль, *MSG* и другие добавки, молоко. Низкое содержание в пищевом сырье	*Модификатор вкуса:* NaCl используется для придания продуктам соленого вкуса *Консервант:* NaCl используется для понижения активности воды в продуктах Многие *разрыхлители* являются натриевыми солями: бикарбонат, сульфат натрия-алюминия, гидропирофосфат
Сера (S)	Сера широко распространена как составная часть серосодержащих аминокислот, входит в состав пищевых добавок (сульфиты, SO_2)	*Ингибитор потемнения:* диоксид серы и сульфиты ингибируют ферментативное и неферментативное потемнение. Широко используется в сушке фруктов. Обладает антимикробным действием. Широко применяется в виноделии
Цинк (Zn)	Мясо, злаковые культуры, обогащенные пищевые продукты	ZnO используется в покрытиях консервных банок, предназначенных для белковых продуктов, для уменьшения образования FeS черного цвета при нагревании

8.5.1. Кальций

Функции кальция в молоке и молочных продуктах хорошо изучены и являются примером реакций с участием минеральных соединений в пищевых системах (см. главу 14). Молоко содержит целый комплекс минеральных компонентов — кальций, магний, натрий, калий, хлорид, сульфат и фосфат. Кальций в молоке распределен между сывороткой и казеиновыми мицеллами. Сывороточный кальций находится в растворе и составляет около 30% общего кальция в молоке. Остаток кальция связан с казеиновыми мицеллами и присутствует преимущественно в виде коллоидного фосфата кальция. Вероятно, ассоциация субмицелл осуществляется за счет кальциевых мостиков между фосфатными группами, этерифицированными сериновыми остатками в казеине, и неорганическими фосфат-ионами.

Кальций и фосфат играют важную роль в производстве сыра. Введение кальция перед сычужным свертыванием снижает время коагуляции [64]. Творог с более низким содержанием Ca имеет рыхлую текстуру, в то время как богатые кальцием сыры более упругие.

8.5.2. Фосфаты

Фосфаты присутствуют в пище в различных формах — как нативные соединения растительных и животных тканей, так и в составе пищевых добавок. Свойства пищевых фосфатов рассмотрены в многочисленных публикациях — см., например, работы [31] и [76]. В качестве разрешенных пищевых добавок используют различные формы фосфатов (фосфорную кислоту, ортофосфаты, пирофосфаты, триполифосфаты и высшие полифосфаты, структуры которых представлены на рис. 8.15).

Фосфатные пищевые добавки выполняют роль подкислителей (в безалкогольных напитках), буферных добавок (в различных напитках), антислеживателей, разрыхлителей, стабилизаторов, эмульгаторов, увлажнителей, а также антиокислителей. Причины столь широкой их функциональности пока до конца не выявлены (неясно, например, почему в присутствии фосфатов мясо и рыба приобретают повышенную влагоудерживающую способность), но, безусловно, она связана с кислотностью связанных с фосфатом протонов и зарядом фосфат-ионов. При обычных для пищевых продуктов значениях pH фосфаты имеют отрицательный заряд, а полифосфаты обладают свойствами полиэлектролитов. Отрицательный заряд придает фосфатам свойства сильного основания Льюиса, способного эффективно связывать катионы металлов.

8.5.3. Хлорид натрия

Хлорид натрия (поваренная соль) широко используется в качестве добавки к пищевым продуктам. Преимущества NaCl — это выраженный соленый вкус, регулирование роста микроорганизмов, повышение влагоудерживающей способности мяса, а также влияние на цвет продукта. Соль не только придает специфический соленый вкус, но и усиливает вкус других ингредиентов и ослабляет ощущение горечи. Во многих продуктах с добавленной солью (например, в хлебобулочных изделиях и другие зерновых продуктах) вкус соли не ощущается, поэтому зачастую довольно трудно оценить количество соли в продукте по вкусу. Вклад различных источников натрия в общее его потребление в США приведен в табл. 8.19.

Соль — необходимый ингредиент большинства сыров, придающий им специфический вкус, помогающий регулировать рост нежелательных бактерий за счет снижения активности воды, влияющий на скорость сбраживания молочной кислоты и изменение текстуры сыра [90].

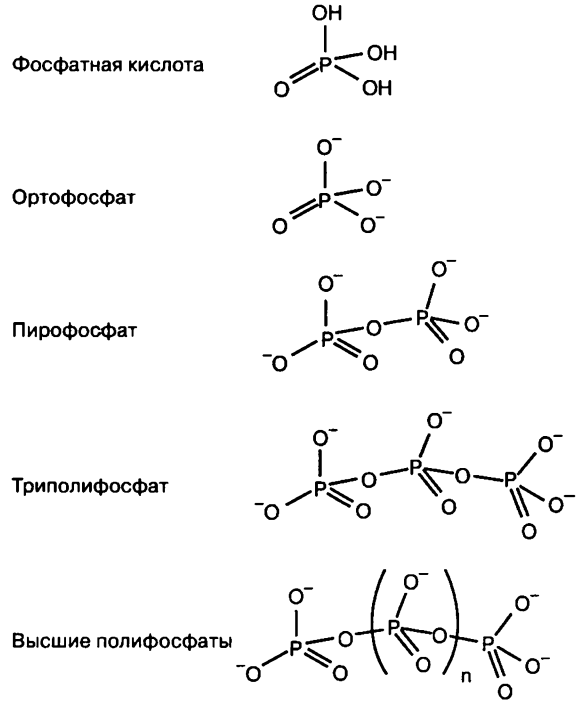


Рис. 8.15. Структура фосфорной кислоты и некоторых форм фосфатов

Таблица 8.19
Вклад различных продуктов в потребление натрия населением США. По [32]

Пищевые продукты	Вклад в потребление Na, % от общего потребления
Молоко и молочные продукты	6,5
Зерновые продукты	22,0
Фрукты и овощи	6,6
Мясо, рыба, птица и яйца	26,1
Готовые блюда (запеканки, супы и т. д.)	22,1
Жиры, масла и соусы	8,2
Десерты и сладости	4,8
Прочие	3,8

В таких мясных продуктах, как колбасы и сосиски, соль выполняет роль консерванта, снижая значение активности воды. Она также способствует солюбилизации мышечных белков за счет эффекта посола; впоследствии эти белки действуют как эмульгаторы [42].

В хлебобулочных изделиях соль влияет на вкус, не делая его при этом слишком соленым, регулирует скорость брожении дрожжевого теста, а также выполняет функции улучшителя муки путем взаимодействия с белками клейковины [90].

8.5.4. Железо

Хорошо известно, что железо ускоряет процесс окисления липидов в пище, причем как стадию инициирования, так и стадию развития окисления. Химия окисления липидов чрезвычайно сложна, и ее описывают разными механизмами. В присутствии восстановителей (например, тиолов и аскорбиновой кислоты), ион Fe^{3+} способствует образованию супероксид-аниона [118]:

$$Fe^{3+} + RSH \rightarrow Fe^{2+} + RS^{\bullet} + H^{+}$$

$$RSH + RS^{\bullet} + O_2 \rightarrow RSSR + H^{+} + {}^{\bullet}O^{-}_{2}$$

Затем супероксидный анион в кислой среде диспропорционирует с образованием пероксида водорода или восстанавливает ион Fe^{3+} до Fe^{2+}:

$$2H+ + 2{}^{\bullet}O^{-}_{2} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$Fe^{3+} + {}^{\bullet}O^{-}_{2} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Ион Fe^{2+} реагирует с пероксидом водорода с образованием гидроксильных радикалов (реакция Фентона):

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + {}^{\bullet}OH$$

Гидроксильные радикалы чрезвычайно реакционноспособны и генерируют липидные свободные радикалы, отщепляя атомы водорода от ненасыщенных жирных кислот. Так инициируется цепная реакция окисления липидов.

Железо также может катализировать окисление липидов, ускоряя разложение гидропероксидов липидов, присутствующих в пищевых продуктах:

$$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + LO + OH^{-}$$

или

$$Fe^{3+} + LOOH \rightarrow Fe^{2+} + LOO^{\bullet} + H^{+}$$

Скорость первой реакции примерно на порядок выше, чем второй. Этим можно объяснить тот факт, что аскорбиновая кислота в некоторых пищевых продуктах выполняет роль прооксиданта, восстанавливая ион Fe^{3+} до Fe^{2+}.

8.5.5. Никель

Хотя дефицит никеля еще не был отмечен у человека, имеются доказательства его эссенциальности для некоторых животных [81]. Для никеля отсутствуют рекомендуемые нормы и уровни потребления. Источниками никеля являются шоколад, орехи, бобовые и зерновые культуры [81]. Важное значение для пищевой промышленности имеет использование никеля в качестве катализатора при получении гидрогенизированных жиров [78] (см. главу 4).

8.5.6. Медь

Медь, как и железо, является элементом переменной валентности. В пищевых системах медь присутствует в виде ионов Cu^{1+} и Cu^{2+} В качестве кофактора она входит в состав многих ферментов, включая фенолазу, и активного центра гемоцианина — белка-переносчика кислорода у некоторых членистоногих. И Cu^{1+}, и Cu^{2+} образуют прочные комплексы с органическими молекулами, и поэтому в пищевых продуктах медь находится преимущественно в виде комплексов и хелатов. Медь является мощным катализатором окисления липидов — процесса, негативно сказывающегося на качестве пищевых продуктов.

Специфические свойства меди уже не менее 300 лет используются в западноевропейской кухне [69]. Так, во многих кулинарных рецептах приготовления меренг для взбивания яичных белков используются медные сосуды. Известно, что при приготовлении меренг проблемой является разрушение пены при взбивании (по-видимому, вследствие денатурации белков). В яичном белке содержится кональбумин — протеин, аналогичный связывающему железо трансферрину. Кональбумин связывает и Cu^{2+}, и Fe^{3+}, а присутствие связанных железа или меди стабилизирует кональбумин относительно чрезмерной денатурации [84].

8.6. Заключение

Минеральные вещества присутствуют в пище в небольших количествах, изменяющихся в широких пределах; формы их присутствия весьма различны и претерпевают большие изменения при производстве пищевых продуктов, их хранении и переваривании пищи. За исключением элементов групп I-A и VII-A, другие минеральные вещества присутствуют в пищевых продуктах в виде комплексов, хелатов или оксианионов. Несмотря на то что свойства многих минеральных соединений пищи изучены еще недостаточно, их поведение в пищевой системе зачастую можно спрогнозировать, используя знание принципов неорганической, органической, физической химии и биохимии.

Основная роль минеральных компонентов пищи — это обеспечение надежного и сбалансированного поступления в организм необходимых нутриентов в усвояемой форме. Если концентрация и/или усвояемость эссенциальных нутриентов в пищевых продуктах малы, то для обеспечения адекватности рационов всех слоев населения пищевые продукты необходимо обогащать теми или иными нутриентами. Обогащение железом и йодом, проводимое в США и других промышленно развитых странах, существенно снизило число людей, страдающих заболеваниями, вызванными дефицитом этих нутриентов. К сожалению, во многих развивающихся странах обогащение пищевых продуктов не проводится, что приводит к тяжелым последствиям, связанным с дефицитом железа, йода, цинка и других веществ.

Минеральные компоненты играют важную функциональную роль в пищевых продуктах, значительно изменяя их цвет, текстуру, вкус и стабильность. Для достижения определенного функционального эффекта минеральные вещества могут быть удалены или добавлены к пищевому продукту. Если же менять содержание минеральных веществ в пищевых продуктах по тем или иным соображениям нерационально, то изменить их функциональные свойства можно путем применения таких комплексообразователей (хелатных агентов), как, например, ЭДТА (если их использование в пищевых продуктах разрешено).

Литература

1. Ahmed R. E. Trace metal contaminants in food // *Environmental Contaminants in Food* / C. F. Moffat, K. J. Whittle (eds). — Ch. 6. —Sheffield, England: Sheffield Academic Press, 1999. — P. 146–214.
2. Allaway W. H. The effects of soils and fertilizers on human and animal nutrition // *Agriculture Information Bulletin No. 378.* — Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture. 1975.

3. Alissa E. M., Bahijri S. M., Ferns G. A. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence // *Med. Sci. Monit. (Medical Science Monitor: Intern. Med. J. of Experimental and Clinical Research),* 2003, 9, p. RA9–18.
4. Anderson J .J. B., Sell M. L., Garner S. C., Calvo M. S.. Phosphorus // *Present Knowledge in Nutrition* / B. A. Bowman, R. M. Russell (eds). — 8th ed. — Ch. 27. — Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 281–291.
5. *Official Methods of Analysis* / AOAC. — 15th ed. — Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
6. Bailey L. B., Moyers S., Gregory J. F. Folate // *Present Knowledge in Nutrition*/ B. A. Bowman, R. M. Russell (eds). — 8th ed. — Ch. 21. — Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 214–229.
7. Ballew C., Bowman B. Recommending calcium to reduce lead toxicity in children: a critical review // *Nutr. Rev.,* 2001, 59, p. 71–79.
8. Barrett F., Ranum P. Wheat and blended cereal foods // *Iron Fortification of Foods* / F. M. Clydesdale, K. L. Wiemer (eds) — Orlando, FL: Academic Press, 1985. — P. 75–109.
9. Baynes R. D., Bothwell T. H. Iron deficiency // *Annu. Rev. Nutr.,* 1990, 10, p. 133–148.
10. Bothwell T. H., MacPhail A. P. The potential role of NaFeEDTA as an iron fortificant // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.,* 2004, 74, p. 421–434.
11. Burk R. F., Levander O. A. Selenium // *Modern Nutrition in Health and Disease* / M. E. Shills, J. A. Olson, M. Shike, A. C. Ross (eds). — 9th ed. — Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkens, 1999. — P. 265–276.
12. Canfield R. L., Henderson Jr. C. R., Cory-Slechta D. A., Cox C., Jusko T. A., Lanphear B. P. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter // *N. Engl. J. Med.,* 2003, 348, p. 1517–1526.
13. Carpenter K. J. Episodes in the history of food fortification // *Cereal Foods World,* 1995, 42, p. 54–57.
14. Carpenter C. E., Hendricks D. G. Mineral analysis // *Food Analysis.* — 3rd ed. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 189–203.
15. Chen J., Zhao X., Zhang X. et al. Studies on the effectiveness of NaFeEDTA-fortified soy sauce for controlling iron deficiency: a population-based intervention trial // *Food Nutr. Bull.,* 2005, 26, p. 177–186.
16. Chiancone E., Ceci P., Ilari A., Ribacchi F., Steranini S. Iron and proteins for iron storage and detoxification // *Biometals,* 2004, 17, p. 197–202.
17. Clark L. C., Combs Jr. G. F., Turnbull B. W. et al. The nutritional prevention of cancer with selenium 1983–1993: a randomized clinical trial // *J. Am. Med. Assn.,* 1996, 276, p. 1957–1963.
18. Clarkson T. W., Magos L., Meyers G. J. The toxicology of mercury // *N. Eng. J. Med.,* 2003, 349, p. 1731–1737.
19. Clarkson T. W., Strain J. J. Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations // *J. Nutr.,* 2003, 133 (Suppl. 1), p. 1539S–1543S.
20. Combs G. F. Selenium in global food systems // *Br. J. Nutr.,* 2001, 85, p. 517–547.
21. Cousins R. J. Zinc // *Present Knowledge in Nutrition* / E. E. Ziegler, L. J. Filer Jr. (eds). — 7th ed. — Ch. 29. — Washington, D.C.: ILSI Press, 1996. — P. 293–306.
22. Chrichton R. R. Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: Ellis Horwood Series in Inorganic Chemistry / J. Burgess (series ed.). — NY: Ellis Horwood, 1991.
23. Cubadda R., Raggi A., Zanasi F., Carcea M. From durum wheat to pasta: effect of technological processing on the levels of arsenic, cadmium, lead and nickel — a pilot study // *Food Addit. Contam.,* 2003, 20, p. 353–360.
24. da Silva J. J. F. R., Williams R. J. P. The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life. — Oxford: Clarendon Press, 1991.
25. Delange F., Burgi H., Chen Z. P., Dunn J. T. World status of monitoring of iodine deficiency disorders control programs // *Thyroid,* 2002, 12, p. 915–924.
26. Delange K., de Benoist B., Pretell E., Dunn J. T. Iodine deficiency in the world: where do we stand at the turn of the century? // *Thyroid,* 2001, 11, p. 437–447.
27. Deshpande S. S. Toxic metals, radionuclides, and food packaging contaminants // *Handbook of Food Toxicology* / S. S. Deshpande (ed). — Ch. 16. — NY: Marcel Dekker, Inc. 2002. — P. 783–812.
28. Dibley M. J. Zinc // *Present Knowledge in Nutrition* / B. A. Bowman, R. M. Russell (eds). — 8th ed. — Ch. 31. — Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 329–343.
29. Dutra-de-Oliveira J. E., Freitas M. L. S., Ferreira J. F., Gonçalves A.-L., Marchini J. S. Iron from complex salts and its bioavailability to rats // *Int. J. Vit. Nutr. Res.,* 1995, 65, p. 272–275.
30. Dziezak J. D. Phosphates improve many foods // *Food Technol.,* 1990, 44, p. 80–92.
31. Ellinger R. H. Phosphates in food processing // *Handbook of Food additives* / T. E. Furia (ed.). — 2nd ed. — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 617–780.
32. Engstrom A., Tobelmann R. C., Albertson A. M. Sodium intake trends and food choices // *Am. J. Clin. Nutr.,* 1997, 65 (Suppl.), p. 704S–707S.
33. Farley D. Dangers of lead still linger // *FDA Consumer Magazine,* 1998, 32 (January-February Issue). — См. http://www.fda.gov/fdac/features/1998/198Jead.html; accessed April 2007.
34. Fidler M. C., Walczyk T., Davidsson L., Zeder C., Sakaguchi N., Juneja L. R., Hurrell R. F. A micronized, dispersible ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man // *Br. J. Nutr.,* 2004, 91, p. 107–120.

35. *Mercury Levels in Seafood Species* / Food and Drug Administration. —2001. — См.: http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/hgadv2.pdf; accessed April 2007.
36. *FDA announces advisory on methyl mercury in fish* / Food and Drug Administration // FDA Talk Paper, TO 1–04, January 12, 2001.
37. *Code of Federal Regulations:* Food and Drugs. — Vol. 2 (Revised as of April 1, 2003). — Ch. I, Parts 136, 137, 139. — U.S. Government Printing Office, 2003. — См. http://www.gpoaccess.gov/cfr/index.html
38. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc* / Food and Nutrition Board (FNB), Institute of Medicine (IOM). — Washington, D.C.: National Academy Press, 2002.
39. *Dietary Reference Intake Tables: Elements Table* / Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. — 2003. — См. http://www.iom.edu/file.asp?id=7294; accessed April 2007.
40. *Food Chemicals Codex.* — 5th ed. — Washington, D.C.: National Academy Press, 2003.
41. Fox C. H., Eberl M.. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review // *Complement Ther. Med.,* 2002, 10, p. 229–234.
42. Gelabert J., Gou P., Guerrero L., Arnau J. Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages // *Meat Sci.,* 2003, 65, p. 833–839.
43. Graham R. D., Welch R. M., Bouis H. E. Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives, and knowledge gaps // *Adv. Agronomy,* 2001, 70, p. 77–142.
44. Guinee T. P., Pudja P. D., Farkye N. Y. Fresh acid-cured cheese varieties // *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* / P. F. Fox (ed.). — 2nd ed. — Vol. 2. — London: Chapman & Hall, 1993. —P. 369–371.
45. Harbers L. H., Nielsen S. S. Ash analysis // *Food Analysis* / S. S. Nielsen (ed). — 3rd ed. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 103–111.
46. Harland B., Narala G. Phytate and its hydrolysis products // *Nutr. Res.,* 1999, 19, p. 947–961.
47. Harris H. H., Pickering I. J., George G. N. The chemical form of mercury in fish // *Science,* 2003, 301, p. 1203.
48. Hazell T. Minerals in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability // *World Rev. Nutr. Dietetics,* 1985, 46, p. 1–123.
49. He F. J., MacGregor G. A. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health // *J. Human Hypertension,* 2002, 16, p. 761–770.
50. Heaney R. P., Weaver C. M., Fitzsimmons M. L. Influence of calcium load on absorption fraction // *J. Bone Mineral Res.,* 1990, 5, p. 1135–1138.
51. Hegenauer J., Saltman P., Nace G. Iron III phosphoprotein chelates: stoichiometric equilibrium constant for interaction of iron III and phosphorylserine residues of phosvitin and casein // *Biochem.,* 1979, 18, p. 3865–3879.
52. Herman S., Griffin I. J., Suwarti S., Ernawati F., Permaesih D., Pambudi D., Abrams S. A. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian children // *Am. J. Clin. Nutr.,* 2002, 76, p. 813–817.
53. Hertrampf E., Olivares M. Iron amino acid chelates // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.,* 2004, 74, p. 435–443.
54. Hunt J. R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets // *Am. J. Clin. Nutr.,* 2003, 78, p. 633S–639S.
55. Hurell R. F. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.,* 2004, 74, p. 445–452.
56. International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG) // *Iron EDTA for Food Fortification.* — Washington, D.C.: ILSI Research Foundation, 1993. — P. 27–35.
57. Jarup L. Cadmium overload and toxicity // *Nephrol. Dial. Transplant.,* 2002, 17 (Suppl. 2), p. 35–39.
58. Kapsokefalou M., Miller D. D. Effects of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during in vitro digestion // *J. Food Sci.,* 1991, 56, p. 352–355, 358.
59. Kratzer F. H., Vohra P. *Chelates in Nutrition.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1986.
60. Lachance P. A., Fisher M. C. Effcts of food preparation procedures in nutrient retention with emphasis on food service practices // *Nutritional Evaluation of Food Processing* / E. Karmas, R. S. Harris (eds). — NY: Van Nostrand Reinhold, 1988. — P. 505–556.
61. Lei X. G., Stahl C. H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection // *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 2001, 57, p. 474–481.
62. Lind T., Lonnerdal B., Persson L. A., Stenlund H., Tennefors C., Hernell O. Effects of weaning cereals with different phytate contents on hemoglobin, iron stores, and serum zinc: a randomized intervention in infants from 6 to 12 mo of age // *Am. J. Clin. Nutr.,* 2003, 78, p. 168–175.
63. Loria C. M., Obarzanek E., Ernst N. D. Choose and prepare foods with less salt: dietary advice for all Americans // *J. Nutr.,* 2001, 131, p. 536S–551S.
64. Lucey J. A., Fox P. F. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review // *J. Dairy Sci.,* 1993, 76, p. 1714–1724.
65. Luft F. C. Salt, water, and extracellular volume regulation // *Present Knowledge in Nutrition* / E. D. Ziegler, L. J. Filer (eds). — 7th ed. — Ch. 26. — Washington, D.C.: ILSI Press, 1996. — P. 265–271.

66. Ma J., Betts N. M. Zinc and copper intakes and their major food sources for older adults in the 1994–1996 continuing survey of food intakes by individuals (CSFII) // *J. Nutr.*, 2000, 130, p. 2838–2843.
67. Manary M. J., Krebs N. F., Gibson R. S., Broadhead R. L., Hambidge K. M. Community-based dietary phytate reduction and its effect on iron status in Malawian children // *Ann. Trop. Paediatr.*, 2002, 22, p. 133–136.
68. Mares-Perlman J. A., Subar A. F., Block G., Greger J. L., Luby M. H. Zinc intake and sources in the US adult population: 1976–1980 // *J. Am. Coll. Nutr.*, [S. A.], 14, p. 349–357.
69. McGee H. J., Long S. R., Briggs W. R. Why whip egg whites in copper bowls? // *Nature*, 1984, 308, p. 667–668.
70. Meneton P., Jeunemaitre X., de Wardener H. E., MacGregor G. A. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases // *Physiol. Rev.*, 2005, 85, p. 679–715.
71. Mertz W. The essential elements: nutritional aspects // *Nutr. Today*, 1984, 19, p. 22–30.
72. Meyer P. A., Pivetz T., Dignan T. A., Нота D. M., Schoonover J., Brody D. Surveillance for Elevated Blood Lead Levels Among Children — United States, 1997–2001 // *Surveillance Summaries*, MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report), 52 (No. SS–10). — Atlanta, GA, USA: Centers for Disease Control and Prevention, 2003. — P. 1–21.
73. Miller D. D. Iron fortification of the food supply: a balancing act between bioavailability and iron-catalyzed oxidation reactions // *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries* / T. P. Lyons, K. A. Jacques (eds). — Nottingham: Nottingham University Press, 2002.
74. Miller D. D., Berner L. A. Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? // *Biol. Trace Elem. Res.*, 1989, 19, p. 11–24.
75. Miller D. D., Rutzke M. A. Atomic absorption and emission spectroscopy // *Food Analysis* / S. S. Nielsen, ed. — 3rd ed. — NY: Kluwer Academic/Plenum Pulishers, 2003. — P. 401–421.
76. Molins R. A. *Phosphates in Food.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.
77. Morgan J. N. Effects of processing on heavy metal content of foods // *Impact of Processing on Food Safety* / L. S. Jackson, M. G. Kinze, J. N. Morgan (eds). — Ch. 13. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. — P. 195–211.
78. Mounts T. L. Alternative catalysts for hydrogenation of edible oils // *Hydrogenation: Proceedings of an AOCS Colloquium* / R. Hasten (ed.). — Champaign, IL: American Oil Chemists Society, 1987.
79. Primary Prevention of Hypertension: Clinical and Public Health Advisory from the National High Blood Pressure Education Program / National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP). — 2003. — См. http://www.nhlbi.nih.gov/health/prof/heart/hbp/pphbp.pdf; accessed April 2007.
80. Osteoporosis Overview / National Institutes of Health. — См. http://www.osteo.org/inetdocs/rl06pi.pdf; Accessed September 6, 2005.
81. Nielsen F. H. Boron, manganese, molybdenum, and other trace elements // *Present Knowledge in Nutrition* / B. A. Bowman, R. M. Russel (eds). — 8th ed. — Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 392–393.
82. Nierenberg D. W., Nordgren R. E., Chang M. B., Siegler R. W., Blayney M. B., Hochberg F., Toribara T. Y., Cernichiari E., Clarkson T. Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury // *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338, p. 1672–1676.
83. Patrick J. Elemental sources // *Iron Fortification of Foods* / F. M. Clydesdale, K. L. Wiemer (eds). — Orlando, FL: Academic Press, 1985. — P. 31–38.
84. Phillips L. G, Haque Z., Kinsella J. E. A method for measurement of foam formation and stability // *J. Food Sci.*, 1987, 52, p. 1047–1049.
85. Porterfield W. *Inorganic Chemistry: A Unified Approach.* — 2nd ed. — San Diego, CA: Academic Press, 1993.
86. Prasad A. S., Halsted J. A., Nadimi M. Syndrome of iron deficiency, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia // *Am. J. Med.*, 1961, 31, p. 532–546.
87. Preuss H. G Sodium, chloride, and potassium // *Present Knowledge in Nutrtion.* — 8th ed. — Ch. 29. —Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 302–310.
88. Raboy V. Seeds for a better future: «low phytate» grains help to overcome malnutrition and reduce pollution // *Trend Plant Sci.*, 2001, 6, p. 458–462.
89. Raboy V. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate // *Phytochemistry*, 2003, 64, p. 1033–1043.
90. Reddy K. A., Marth E. H. Reducing the sodium content of foods: a review // *J. Food Protection*, 1991, 54, p. 138–150.
91. Reilly C. Selenium: a new entrant into the functional food arena // *Trend Food Sci, Technol.*, 1998, 9, p. 114–118.
92. Ricahrdson D. P. Food fortification // *Proc. Nutr. Soc.*, 1990, 49, p. 39–50.
93. Rice D. C, Schoeny R., Mahaffey K. Methods and rationale for derivation of a reference dose for methylmercury by the U.S. EPA // *Risk Anal.*, 2003, 23, p. 107–115.
94. Rosado J. L. Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds // *J. Nutr.*, 2003, 133, p. 2985S–2989S.
95. Sandberg A.-S. Bioavailability of minerals in legumes // *Br. J. Nutr.*, 2002, 88, p. S281–S285.
96. Sandstrom B., Arvidsson B., Cederblad A., Bjorn-Rasmussen E. Zinc absorption from composite meals, I: the significance of wheat extraction rate, zinc, calcium, and protein content in meals based on bread // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980, 33, p. 739–745.

97. Satarug S., Baker J. R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P. E., Williams D. J., Moore M. R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population // *Toxicol. Lett.*, 2003, 137, p. 65–83.
98. Satarug S., Haswell-Elkins M. R., Moore M. R. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects // *Br. J. Nutr.*, 2000, 84, p. 791–802.
99. Scrimshaw N. S. Iron deficiency // *Sci. Am.* 1991, 265, p. 46–52.
100. Shriver D. F., Atkins P. W., Langford C. H. *Inorganic Chemistry.* — 2nd ed. — NY: W.H. Freeman, 1994.
101. South P. K., Miller D. D. Iron binding by tannic acid: effects of selected ligands // *Food Chem.*, 1998, 63, p. 167–172.
102. Stanbury J. B. Iodine deficiency and iodine deficiency disorders // *Present Knowledge in Nutrition* / E. E. Ziegler, Filer L. J. (eds). — 7th ed. — Washington, D.C.: ILSI Press, 1996. — P. 378–383.
103. *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorous, Vitamin D, and Flouride* / Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board; Institute of Medicine. — Washington, D.C.: National Academy Press, 1997.
104. Suh J., Zhu B. Z., Frei B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide // *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 34, p. 1306–1314.
105. Tchounwou P. B., Ayensu W. K., Ninashvili N., Sutton D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health // *Environ. Toxicol.*, 2003, 18, p. 149–175.
106. Underwood E. J., Mertz W. *Introduction in Trace Elements in Human and Animal Nutrition* / W. Mertz (ed.). — 5th ed. — San Diego, CA: Academic Press, 1987. — P. 1–19.
107. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Nutrient Data Laboratory / USDA, Agricultural Research Service. — См. http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl; accessed April 2007.
108. Urbano G., Lopez-Jurado M., Aranda P., Vidal-Valverde C, Tenorio E., Porres J. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? // *J. Physiol. Biochem.*, 2000, 56, p. 283–294.
109. van Dokum W. The significance of speciation for predicting mineal bioavailability // *Nutrient Availability: Chemical and Biological Aspects* / D. Southgate, I. Johnson, G. R. Fenwick (eds). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1989. — P. 89–96.
110. Van Thuy P., Berger J., Davidsson L., Cong Khan N., Thi Lam N., Cook J. D., Hurrell R. F., Huy Khoi H. Regular consumption of NaFeEDTA-fortified fish sauce improves iron status and reduces the prevalence of anemia in anemic Vietnamese women // *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78, p. 284–290.
111. Weaver C. M. Calcium // *Present Knowledge in Nutrition* / B. A. Bowman, R. M. Russell (eds). — 8th ed. — Ch. 26. — Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 273–280.
112. Weaver C. M., Plawecki K. L. Dietary calcium: adequacy of a vegetarian diet // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1994, 59, p. 1238S–1241S.
113. Welch R. M., Graham R. D. Breeding crops for enhanced micronutrient content // *Plant Soil*, 2002, 245, p. 205–214.
114. Welch R. M., House W.A. Factors affecting the bioavailability of mineral nutrients in plant foods // *Crops as Sources of Nutrients for Humans* / R. M. Welch (ed.). — Madison, WI: Soil Science Society of America, 1984. — P. 37–54.
115. Welch R. M., House W. A., Allaway W. H. Availability of zinc from pea seeds to rats // *J. Nutr.*, 1974, 104, p. 733–740.
116. Whittaker P., Vanderveen J. E., Di Novi M. J., Kuznesof P. M., Dunkel V. C. Toxicological profile, current use and regulatory issues of EDTA compound for assessing potential use of sodium iron EDTA for food fortification // *Regulat Toxicol. and Pharmacol.*, 1993, 18, p. 419–427.
117. Wong D. W. S. *Mechanism and Theory in Food Chemistry.* — NY: Van Nostrand Reinhold, 1989. — P. 5–7.
118. Sustaining the elimination of iodine deficiency disorders (IDD) / World Health Organization. — 2003. — См.: http://www.who.int/nmh/iodine/en/; accessed April 2007.
119. Yeung C. K., Glahn R. P., Wu X., Liu R. H., Miller D. D. *In vitro* iron bioavailability and antioxidant activity of raisins // *J. Food. Sci.*, 2003, 68, p. 701–705.
120. Yip R. Iron // *Present Knowledge in Nutrition* / B. A. Bowman, R. M. Russell (eds). — 8th ed. — Ch. 23. — Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. — P. 311–328.
121. Yip R., Ramakrishnan U. Experiences and challenges in developing countries // *J. Nutr.*, 2002, 132, p. 827S–830S.
122. Zijp I. M., Korver O., Tijburg L. B. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2000, 40, p. 371–398.

9. КРАСЯЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Стивен Дж. Шварц (*Steven J. Schwartz*), Иоахим Г. фон Эльбе (*Joachim H. von Elbe*),
М. Моника Жюсти (*M. Monica Giusti*)
Перевод И. С. Горожанкиной под науч. ред. д-ра биол. наук В. В. Бессонова

Содержание

9.1. Введение.... 529
9.2. Пигменты в растительных и животных тканях 530
9.2.1. Гемовые соединения 530
9.2.1.1. Мио- и гемоглобин. 531
9.2.1.2. Пигменты посоленного мяса 535
9.2.1.3. Стабильность пигментов мяса 535
9.2.1.4. Роль упаковки 536
9.2.2. Хлорофилл. 536
9.2.2.1. Структура хлорофиллов и их производных 536
9.2.2.2. Физические характеристики. 537
9.2.2.3. Модификации хлорофилла. 539
9.2.2.4. Обесцвечивание в ходе тепловой обработки 544
9.2.2.5. Способы сохранения цвета... 544
9.2.3. Каротиноиды 548
9.2.3.1. Структура каротиноидов. 550
9.2.3.2. Распространенность. 551
9.2.3.3. Физические свойства, экстракция и анализ 551
9.2.3.4. Химические свойства. 552
9.2.3.5. Стабильность в ходе переработки 553
9.2.4. Антоцианы и прочие фенольные соединения. 554
9.2.4.1. Антоцианы. 554
9.2.4.2. Прочие флавоноиды 563
9.2.4.3. Хиноиды и ксантоны. 566
9.2.5. Беталаины.... 566
9.2.5.1. Структура. 566
9.2.5.2. Физические свойства.... 567
9.2.5.3. Химические свойства. 568
9.3. Пищевые красители.. 570
9.3.1. Нормативные аспекты.. 570
9.3.1.1. США. 570
9.3.1.2. Международные нормативные акты.. 572
9.3.2. Свойства сертифицированных красителей 572
9.3.3. Применение сертифицированных пищевых красителей 577
9.3.4. Красители, не подлежащие сертификации 578
9.3.5. Использование красителей, не требующих сертификации 581
Дополнительная литература.. 581
Литература 581

9.1. Введение

Чтобы получить представление о присутствующих в пищевых продуктах красящих веществах, необходимо определить используемые термины. Понятие «цвет» касается человеческого восприятия окрашенных материалов — красный, зеленый, синий и т. д. *Красящее вещество* или «краситель» — это любое придающее цвет химическое соединение, натуральное или синтетическое. Пищевые продукты имеют цвет благодаря их способности отражать или излучать разные количества энергии при длинах волн, способных возбуждать сетчатку глаза. Энергетический диапазон, способный к восприятию зрением человека, называют *видимым светом*, который в зависимости от индивидуальной чувствительности охватывает длины волн в диапазоне примерно от 380 до 770 нм. Этот диапазон составляет очень небольшую часть электромагнитного спектра (рис. 9.1). Помимо очевидных цветовых тонов, цветом считаются также черный, белый и оттенки серого.

Пигменты — это натуральные вещества, присутствующие в клетках и тканях растений и животных, придающие им цвет. *Красители* — это любые вещества, которые придают цвет тем или иным материалам. Термин «краситель» обычно используют в текстильной промышленности*. В пищевой промышленности США краситель — это водорастворимое красящее вещество (краситель) пищевого качества, сертифицированный Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*FDA*). Эти специфические красители называют сертифицированными, и каждому из них присвоен пищевой, фармацевтический и косметический код (*FD&C*). Наличие кода *FD&C* означает, что данный краситель можно использовать в производстве пищевых продуктов, лекарственных препаратов и косметики. В список сертифицированных красителей включены также лаки *FD&C*, которые представляют собой красители на той или иной основе, способные диспергироваться в жире (масле). Комбинация «краситель/основа» обеспечивается адсорбцией, совместным осаждением (соосаждением) или химическим реакциями. Этот комплекс включает соль водорастворимого основного красителя и нерастворимый слой разрешенной к применению основы (единственной разрешенной к применению основой для изготовления лаков *FD&C* является окись алюминия). Вместе с тем существуют и другие красители или лаки, разрешенные к применению в других странах, где действуют нормы ЕС или ВОЗ. Кроме того, могут использоваться красящие вещества, освобожденные от сертификации и представляющие собой натуральные пигменты или синтезированные вещества, идентичные натуральному пигменту. Классификация красящих веществ и их примеры в рамках каждого класса приведены в табл. 9.1**

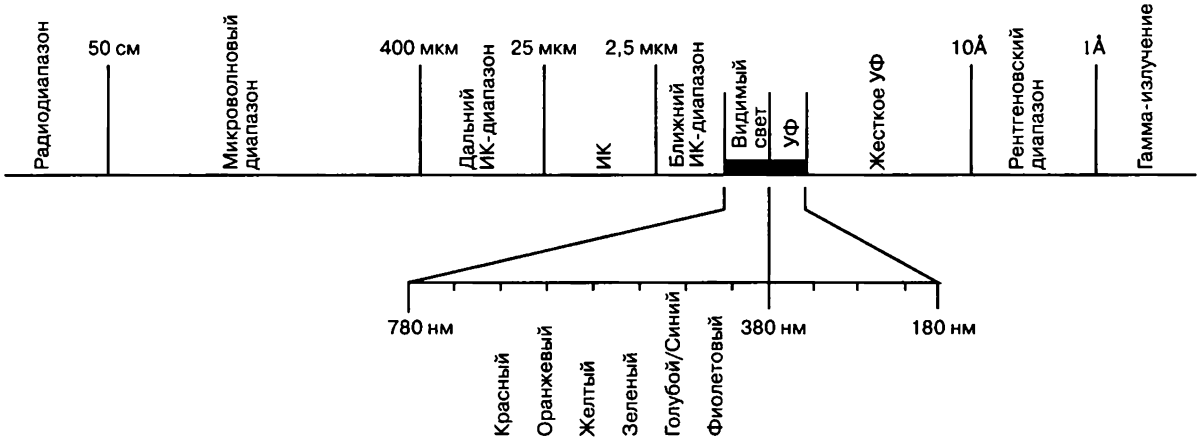


Рис. 9.1. Электромагнитный спектр

*В Российской Федерации, применительно к красителям, предназначенным для использования в производстве пищевых продуктов, используют термины «пищевой краситель» или «пищевая добавка – краситель». — *Примеч. науч. ред.*

**В Российской Федерации группе сертифицированных красителей соответствуют «синтетические пищевые красители». В соответствии с существующими требованиями сертификации подлежат не только синтетические пищевые красители, но и натуральные. Синтетические красители (идентичные натуральным) по терминологии *FDA* в России относятся к группе натуральных. Принятая в России терминология относительно групп красителей соответствует терминологии, принятой в странах ЕС. — *Примеч. ред.*

Таблица 9.1
Классификация красящих веществ

Группы красящих веществ	Примеры
А. Сертифицированные	
1. Красители	*FD&C* Красный № 40
2. Лаки	Лак *FD&C* Красный № 40
В. Освобожденные от сертификации	
1. Натуральные пигменты	Антоцианы, сок концентрированный, экстракт аннато
2. Синтетические (идентичные натуральным)	β-каротин

Существенными, если не самыми важными, качественными свойствами пищевых продуктов являются их цвет и внешний вид. Это обусловлено нашей способностью легко их воспринимать, то есть это первое, что обычно оценивает потребитель при покупке тех или иных пищевых продуктов. Можно предлагать потребителям самые питательные, безопасные и наиболее экономически выгодные пищевые продукты, но если они будут не привлекательны на вид, то покупать их не будут. Кроме того, потребитель увязывает между собой характерный цвет пищевых продуктов и их качество. Характерный для фруктов цвет зачастую обусловлен стадией их спелости, тогда как со свежестью сырого мяса ассоциируется красный цвет, а коричневато-красное мясо воспримается несвежим. Зеленое яблоко может считаться неспелым, несмотря на то что некоторые плоды бывают зелеными и в спелом состоянии.

Цвет влияет и на ощущение вкуса. Так, потребитель традиционно ожидает, что красные напитки будут иметь вкус клубники, малины или вишни, желтые — вкус апельсина, а зеленые — вкус киви или лайма. Известно также влияние цвета на ощущение сладости.

Следует отметить, что многие соединения, ответственные за яркие цвета фруктов и овощей, обладают антиоксидантной активностью. Таким образом, цвет пищевых продуктов оказывает на потребителей множественное влияние, и неправильно считать, что цвет важен только для восприятия внешнего вида.

Многие пищевые пигменты, увы, нестабильны в ходе технологической обработки и хранения. Предотвратить нежелательные их изменения обычно трудно, а зачастую и невозможно. На стабильность разных пигментов влияют такие факторы, как воздействие света, кислорода, металлов, окислителей или восстановителей; температура и активность воды, значение pH... Именно из-за нестабильности нативных пигментов в пищевые продукты иногда вносят пищевые красители [31, 77].

В настоящей главе мы постараемся дать общее представление о химии окрашивающих веществ, знание которой необходимо для управления цветом и цветовой стабильностью пищевых продуктов.

9.2. Пигменты в растительных и животных тканях

Пигменты, нативно присутствующие в тканях растений и животных, синтезируются, накапливаются и выделяются живыми клетками. Превращения, происходящие в пищевых продуктах в ходе их переработки, приводят к формированию или изменению этих окрашивающих веществ. Нативные пигменты животных и растений всегда были частью нормального рациона человека и, следовательно, их употребление было безопасным в течение жизни многих поколений. Химическая структура таких нативных красящих веществ довольно сложна и используется как основа для их классификации (табл. 9.2).

9.2.1. Гемовые соединения

Гемовые пигменты отвечают за цвет мяса. Основным пигментом является миоглобин (*Mb*), а гемоглобин (пигмент крови) имеет второстепенное значение (большая часть гемоглобина удаляется при убое и обескровливании животных). В правильно обескровленной мышечной ткани более чем 90% пигментации обусловлено *Mb*. Его количество в мышечных тканях широко варьирует и зависит от вида, возраста, пола и физиологической активности животного. Например, в бледно-окрашенной телятине содержание *Mb* ниже, чем в говядине, имеющей красную окраску. Очевидны и различия между мышечными тканями одного и того же животного, причем они обусловлены разным содержанием *Mb* в мышечных волокнах.

Таблица 9.2
Классификация растительных и животных пигментов по их их химической структуре

Химическая группа	Пигмент	Примеры	Цвет	Примеры пищевых продуктов
Тетрапирролы	Гемовые соединения	Оксигемоглобин	Красный	Свежее мясо
		Миоглобин	Пурпурный или красный	
		Метмиоглобин	Коричневый	Мясо в упаковке
	Хлорофилл	Хлорофилл *a*	Сине-зеленый	Брокколи, салат-латук, шпинат
		Хлорофилл *b*	Зеленый	
Тетратерпеноиды	Каротиноиды	Каротин	Желто-оранжевый	Морковь, апельсины, персики, сладкий перец
		Ликопин	Оранжево-красный	Томаты
О-гетероциклические соединения/хиноны	Флавоноиды и фенольные соединения	Антоцианы	Оранжевый, красный, голубой (синий)	Ягоды, красные яблоки, краснокочанная капуста, редиска
		Флавонолы	Белый или желтый	Лук репчатый, цветная капуста
		Таннины	Красно-коричневый	Выдержанное вино
N-гетероциклические соединения	Беталаины	Бетанин	Пурпурный или красный	Свекла обыкновенная, листовая свекла, колючая груша (плод опунции)
		Бетаксантины	Желтый	

Примером может служит мясо птицы, где светло-окрашенная грудка легко отличима от мышечной ткани голени и бедра, имеющей темный цвет. Основные пигменты свежего, консервированного и подвергнутого тепловой обработке мяса приведены в табл. 9.3. К второстепенным пигментам мышечных тканей относятся цитохромные ферменты, флавины и витамин B_{12}.

9.2.1.1. Мио- и гемоглобин

9.2.1.1.1. Структура гемовых соединений

Миоглобин является глобулярным белком, состоящим из одиночной полипептидной цепи. Его молекулярная масса составляет 16,8 кДа, и состоит он из 153 аминокислот. Белковая часть молекулы миоглобина называется глобином.

Хромофорный компонент, отвечающий за светопоглощение и цвет — это порфирин, известный как гем. Порфириновое кольцо образовано четырьмя соединенными вместе пиррольными кольцами, связанными с центрально расположенным атомом железа. Таким образом, *Mb* является комплексом из глобина и гема (рис. 9.2). Гемопорфирин расположен внутри гидрофобного кармана глобина и связан с гистидиновым остатком (рис. 9.3). У расположенного в центре атома железа шесть сайтов координационного связывания, четыре из которых заняты атомами азота внутри тетрапиррольного кольца. Пятый координационный сайт связан гистидиновым остатком глобина, а шестой сайт остается доступным для комплексирования с отрицательно заряженными атомами, донорами которых являются различные лиганды.

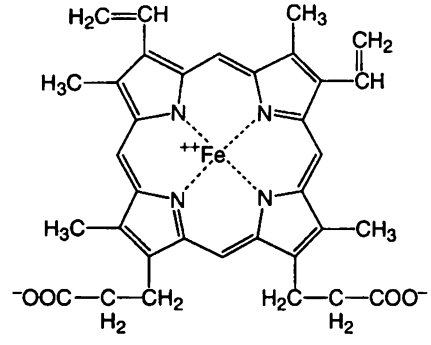


Рис. 9.2. Химическая структура гема

Гемоглобин состоит из четырех молекул *Mb*, связанных в виде тетрамера. Гемоглобин, компонент красных кровяных телец, образует с кислородом в легких обратимые комплексы, который переносится с кровью в различные ткани организма животного, где кислород поглощается. Молекулярный кислород связывает именно гемовая группа. Внутри клеточной ткани *Mb* действует сходным образом, являясь акцептором переносимого гемоглобином кислорода. Тем самым *Mb* сохраняет кислород внутри тканей, делая его доступным для метаболизма.

Таблица 9.3

Основные пигменты свежего, консервированного мяса и мяса после тепловой обработки. По [84]

Пигмент	Способ (режим) образования	Состояние железа	Состояние гематинового ядра	Состояние глобина	Цвет
1. Миоглобин	Восстановление метмиоглобина; дезоксигенирование оксимиоглобина	Fe^{2+}	Интактное	Нативный	Пурпурно-красный
2. Оксимиоглобин	Оксигенация миоглобина	Fe^{2+}	Интактное	Нативный	Ярко-красный
3. Метмиоглобин	Оксигенация миоглобина и оксимиоглобина	Fe^{3+}	Интактное	Нативный	Коричневый
4. NO-миоглобин (нитрозомиоглобин)	Соединение миоглобина с оксидом азота	Fe^{2+}	Интактное	Нативный	Светло-красный (розовый)
5. NO-метмиоглобин (нитрозометмиоглобин)	Соединение метмиоглобина с оксидом азота	Fe^{3+}	Интактное	Нативный	Малиновый
6. Метмиоглобина нитрит	Соединение метмиоглобина с избытком нитрита	Fe^{3+}	Интактное	Нативный	Красновато-коричневый
7. Глобинмиогемохромоген	Влияние тепла и денатурирующих веществ на миоглобин и оксимиоглобин; воздействие на глобингемихромоген излучением	Fe^{2+}	Интактное (обычно связано с денатурированным белком, отличным от глобина)	Денатурирован (обычно отделен)	Тусклый красный
8. Глобинмиогемихромоген	Воздействие тепла, денатурирующих агентов на миоглобин, окси- и метмиоглобин, а также на гемохромоген	Fe^{3+}	Интактное (обычно связано с денатурированным белком, отличным от глобина)	Денатурирован (обычно отделен)	Коричневый (иногда сероватый)
9. NO-миогемохромоген	Воздействие тепла и денатурирующих агентов на NO-миоглобин	Fe^{2}+	Интактное	Денатурированный	Светло-красный (розовый)
10. Сульфомиоглобин	Воздействие H_2S и кислорода на миоглобин	Fe^{3+}	Интактное, но одна двойная связь насыщена	Нативный	Зеленый
11. Метсульфомиоглобин	Окисление сульфомиоглобина	Fe^{3+}	Интактное, но одна двойная связь насыщена	Нативный	Красный
12. Холеглобин	Воздействие перекиси водорода на миоглобин или оксимиоглобин; воздействие на оксимиоглобин аскорбиновой кислоты или других восстанавливающих агентов	Fe^{2+}или Fe^{3+}	Интактное, но одна двойная связь насыщена	Нативный	Зеленый
13. Нитригемин	Действие большого избытка нитрита и нагревания на нитрозометмиоглобин	Fe^{3+}	Интактное, но восстановленное	Отсутствует	Зеленый
14. Вердогем	Действие избытка реагентов как в пп.7–9	Fe^{3}+	Порфириновое кольцо разомкнуто	Отсутствует	Зеленый
15. Пигменты желчи	Действие большого избытка реагентов как в пп.7–9	Fe отсутствует	Порфириновое кольцо разрушено; цепь порфиринов	Отсутствует	Желтый или бесцветный

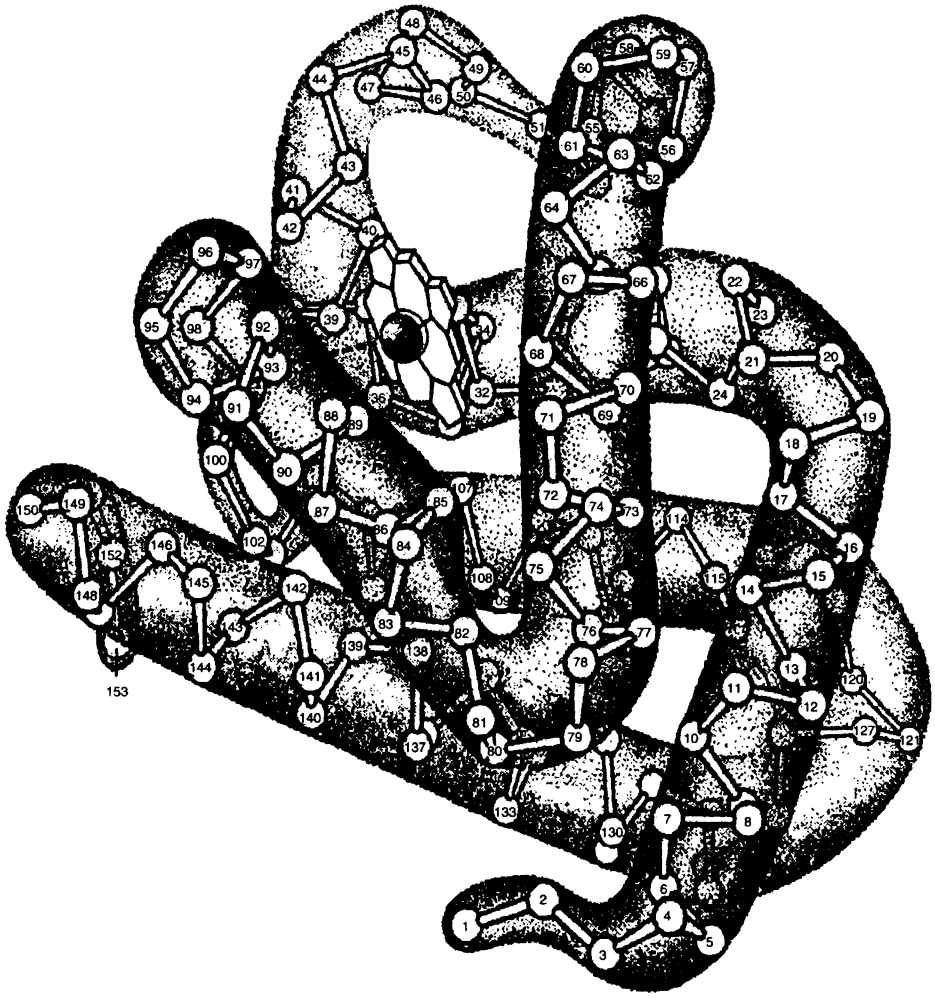


Рис. 9.3. Третичная структура миоглобина. По [49]

9.2.1.1.2. Химия цвета. Окисленное состояние

Цвет мяса определяется химией *Mb*, состоянием его окисления, типом связанных с гемом лигандов и состоянием глобина. Железо гема внутри порфиринового кольца может существовать в двух формах: либо в восстановленной форме двухвалентного железа (ферро-форме, +2), либо в окисленной форме трехвалентного железа (ферри-форме, +3). Такое состояние окисления атома железа в составе гема следует отличать от оксигенации *Mb*. При связывании молекулярного кислорода с *Mb* образуется оксимиоглобин (MbO_2), и этот процесс называют оксигенацией. При окислении *Mb* атом железа переходит в трехвалентное состояние (+3), образуя метмиоглобин (*MMb*). Когда гемовое железо находится в двухвалентном состоянии (+2), в котором у него в шестой позиции нет связанного лиганда, то соединение называют миоглобином.

Мышечная ткань, содержащая главным образом *Mb* (также называемый дезоксимиоглобином), имеет пурпурно-красный цвет. Связывание молекулярного кислорода в шестом лиганде приводит к образованию MbO_2, и цвет мышечной ткани меняется на алый. Как пурпурно-красный *Mb*, так и алый MbO_2 могут окисляться, изменяя состояние железа с двухвалентного на трехвалентное. Если это изменение происходит посредством самоокисления, то эти пигменты приобретают нежелательный коричневатый оттенок, свойственный *MMb*. В этом состоянии *MMb* не способен связывать кислород, и шестая координационная позиция занята молекулой воды [35]. *MMb* мяса можно восстановить обратно в *Mb* как ферментативным,

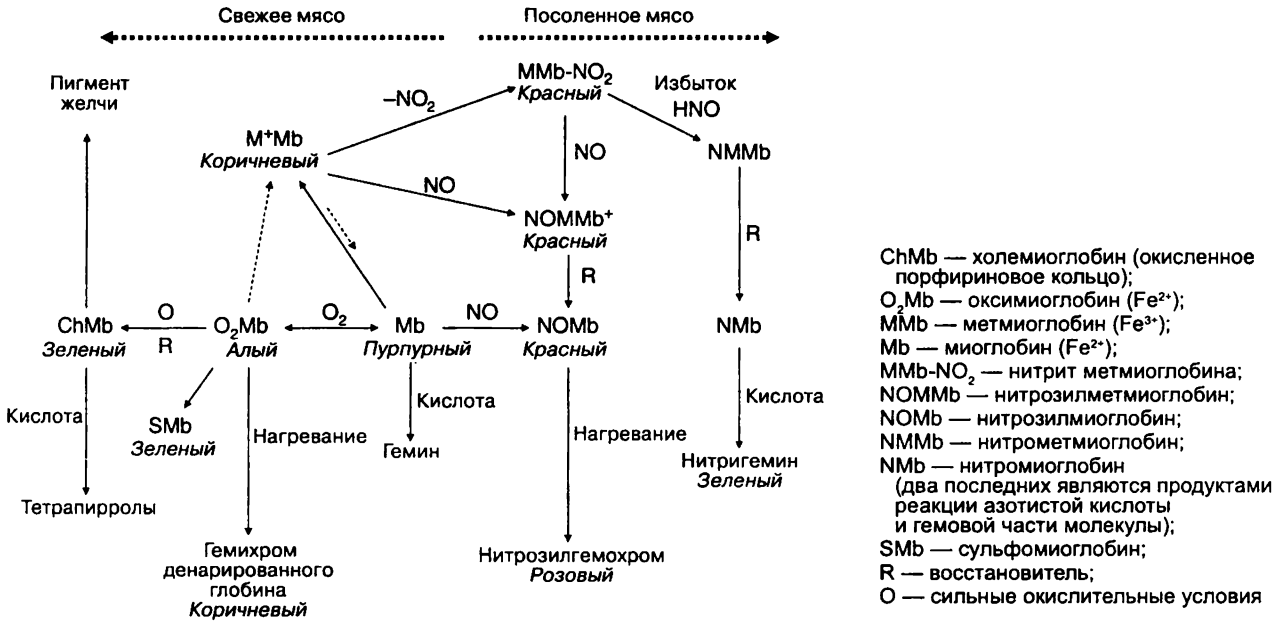


Рис. 9.4. Реакции миоглобина в свежем и посоленном мясе. По [43]

так и неферментативным путем. Основной метаболический путь, по-видимому, определяется действием *MMb*-редуктазы, которая в присутствии *NADH* эффективно восстанавливает *MMb* в двухвалентное состояние [57, 99, 103]. Различные реакции гемового пигмента показаны на рис. 9.4. Реакции, сопровождающиеся изменением цвета, в свежем мясе динамичны и определяются условиями в мышечной ткани и возникающим в результате соотношением *Mb, MMb* и MbO_2. Если взаимопревращения *Mb* и MbO_2 происходят легко и спонтанно (в зависимости от парциального давления кислорода), то превращение *MMb* в другие формы требует ферментативного или неферментативного восстановления трехвалентного железа до двухвалентного.

Взаимосвязь между парциальным давлением кислорода и процентным содержанием гемового пигмента каждого типа представлена на рис. 9.5. Высокое парциальное давление кислорода благоприятствует окислению с образованием алого MbO_2. Когда свежее разрезанное мясо подвергается воздействию кислорода окружающей среды, в нем быстро проявляется «натуральный» цвет, то есть ярко-красное окрашивание, являющееся результатом быстрого превращения *Mb* в MbO_2. И наоборот, низкое парциальное давление кислорода способствует образованию *Mb* и *MMb*. Для активизации образования MbO_2 полезно, чтобы окружающая среда была насыщена кислородом. Скорость образования *MMb*, обусловленного окислением гема (Fe^{2+} Fe^{3+}) можно минимизировать путем удаления кислорода. Мышечные ткани характеризуются разным парциальным давлением кислорода, что обусловливает разное относительное содержание каждой из форм пигмента.

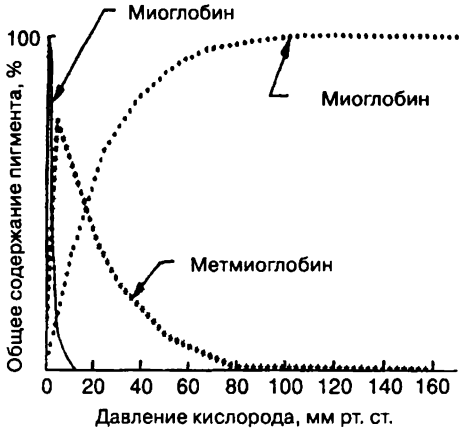


Рис. 9.5. Влияние парциального давления кислорода на химические состояния миоглобина. По [40]

Известно, что присутствие глобина снижает скорость окисления гема ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$). Кроме того, при более низких значениях pH окисление происходит быстрее, причем скорость самоокисления MbO_2 ниже, чем у *Mb*. Самоокислению способствует присутствие следовых количеств металлов, особенно ионов меди.

9.2.1.1.3. Химия цвета. Изменение цвета

Причиной позеленения *Mb* могут быть две разных реакции [84]. Перекись водорода может реагировать с сайтом гема, содержащим либо двухвалентное, либо трехвалентное железо, приводя к образованию холеглобина (пигмента зеленого цвета). Кроме того, в присутствии сероводорода и кислорода может образовываться зеленоватый сульфомиоглобин.

Считается, что в результате бактериального роста продуцируются перекись водорода и/или сероводород. Третий механизм образования зеленоватого окрашивания встречается у посоленного мяса (см. раздел 9.2.1.2).

9.2.1.2. Пигменты посоленного мяса

В производстве большинства видов посоленного мяса для улучшения цвета и вкуса, а также для подавления роста *Clostridium botulinum* в него добавляют нитраты или нитриты. При посоле происходят специфические реакции, обусловливающие стабильную розоватую окраску посоленных мясных продуктов. Схематически эти реакции представлены на рис. 9.4, а ответственные за них соединения — в табл. 9.3.

В первую очередь происходит реакция между оксидом азота (NO) и *Mb* с образованием комплекса оксида азота с миоглобином (*Mb*NO), известного как нитрозилмиоглобин и имеющего нестабильный алый цвет. При нагревании образуется более стабильный комплекс оксида азота с *Mb*, называемый миогемохромоген (нитрозил гемохром), который придает посоленному мясу желаемую розоватую окраску. При нагревании глобин денатурируется, но розовое окрашивание сохраняется. В присутствии *MMb* для реакции с NO для превращения *MMb* в *Mb* требуются восстанавливающие агенты, в противном случае нитрит может взаимодействовать непосредственно с *MMb*. В присутствии избытка азотистой кислоты будет образовываться нитромиоглобин (*NMb*), который при нагревании в восстанавливающей среде превращается в нитригемин (зеленый пигмент). Эта последовательность реакций является причиной дефекта мяса, известного как «нитритный ожог».

В отсутствие кислорода комплексы NO с *Mb* относительно стабильны, но эти пигменты чувствительны к действию света (особенно в аэробных условиях). Восстановительному превращению нитрита в NO способствует добавление таких восстановителей, как аскорбат или сульфгидрильные соединения.

Особым видом ветчины, которую производят с использованием только свинины и соли без добавления нитратов или нитритов, является пармская ветчина. В процессе ее вяления образуется новый пигмент Zn-протопорфирин, в котором железо гема замещается цинком [150]. Эти пигменты и обусловливают стабильный яркий красный цвет пармской ветчины. Подробнее о химии пигментов посоленного мяса см. работы [44, 85, 107].

9.2.1.3. Стабильность пигментов мяса

Основным фактором, определяющим выбор мясных продуктов потребителями, является цвет мышечной ткани. На стабильность мясных пигментов влияют многие факторы, действующие в этой сложной пищевой системе. При этом решающее значение имеют взаимодействия между разными факторами, что затрудняет определение причин и результатов взаимодействий. К условиям окружающей среды, существенно влияющим на цвет мяса и стабильность пигментов, относятся освещенность, температура, относительная влажность, значение pH и присутствие специфических бактерий [35, 80].

Известно, что скорость окисления пигментов повышают такие специфические реакции, как окисление липидов [36]. Стабильность цвета можно улучшить путем внесения антиоксидантов — аскорбиновой кислоты, витамина Е, бутилгидроксианизола (*BHA*, БГА) или пропилгаллата [54]. Эффективной процедурой для увеличения стабильности липидов и цвета в мясных продуктах, впоследствии получаемых из мяса животных, является внесение в корма этих животных витамина Е [34]. Показано, что указанные соединения препятствуют окислению липидов и способствуют сохранению окраски мышечных тканей. На стабильность цвета свежего мяса влияют и биохимические факторы — в частности, скорость потребления кислорода перед убоем и активность *MMb*-редуктазы [92].

Причиной изменений цвета мясных продуктов может быть действие излучения, что обусловлено чувствительностью молекул *Mb*, главным образом железа, к модификации химического окружения и к по-

ступающей энергии. При облучении может наблюдаться обесцвечивание стабильных красных пигментов, коричневого пигмента и даже изменение цвета мяса на зеленый. Способствовать получению оптимального цвета в процессе облучения может также сочетание предубойного кормления скота антиоксидантами, кондиционирование мяса перед облучением, внесение антиоксидантов, использование упаковки в модифицированной газовой среде и контроль температуры [12]*.

Многие потребители определяют степени готовности по внутреннему виду приготовленного (прошедшего тепловую обработку) мяса (например, котлет из говяжьего фарша), однако использованию цвета внутренней части приготовленного продукта в качестве индикатора препятствуют два явления, а именно преждевременное окрашивание в коричневатый цвет и стойкий розовый цвет. В первом случае мясо выглядит приготовленным даже несмотря на то, что внутри продукта еще не достигнута температура, летальная для патогенных микроорганизмов, во втором цвет некоторых мясных продуктов остается розовым даже после достижения внтури продукта безопасных температур термообработки, что может привести к избыточной тепловой обработке. Из этого следует, что цвет мяса не следует использовать как индикатор степени готовности мясных продуктов [64, 76].

9.2.1.4. Роль упаковки

Одним из важнейших способов стабилизации цвета мяса является хранение в соответствующих условиях. Так, использование упаковки в модифицированной газовой среде увеличивает срок годности мясных продуктов. Для этого требуется использовать упаковочные пленки с низкой проницаемостью для газов. После упаковывания из упаковки откачивается воздух и вдувается газ специального состава, создающий условия хранения, которые минимизируют изменение цвета вследствие окисления гема ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$). Стабильность цвета можно улучшить путем использования газовой среды, как обогащенной кислородом, так и лишенной его [101]. Мышечная ткань, хранящаяся в бескислородных условиях (например, 100% CO_2) или в присутствии поглотителя кислорода, проявляет хорошую стабильность цвета [115, 141]. Использование методов упаковки в модифицированной газовой среде может приводить и к другим химическим и биохимическим изменениям, влияющим на приемлемость цвета мясных продуктов для потребителей. Частично влияние модифицированной газовой среды на стабильность пигментов связано с ее влиянием на рост и размножение микроорганизмов. Для сохранения качества свежего красного мяса, оптимизируя как показатели микробиологической безопасности, так и органолептическое качество продукции, применяют сочетание кислорода, диоксида углерода и азота. Добавление небольшого количества CO обеспечивает в результате длительный срок годности мяса благодаря образованию карбоксимиоглобина (MbCO), который более стоек к окислению, чем MbO_2 и придает продукту привлекательный ярко-красный цвет [91]. Подробнее об использовании упаковки в модифицированной газовой среде при хранении свежего мяса см. работы [91, 127].

9.2.2. Хлорофилл

9.2.2.1. Структура хлорофиллов и их производных

Хлорофиллы являются основными пигментами в зеленых растениях, водорослях и фотосинтезирующих бактериях и представляют собой производные от порфина магниевые комплексы. Порфин — это полностью ненасыщенная макроциклическая структура, содержащая четыре пиррольных кольца, связанных через мостики, образованные одиночными атомами углерода. Эти пиррольные кольца нумеруют по системе Фишера от I до IV или от *A* до *D* (рис. 9.6). Атомы углерода пиррольных колец на периферии порфиновой структуры нумеруют с 1 до 8, а атомы углерода, образующие мостики, обозначают α, β, γ и δ. Система нумерации *IUPAC* для порфина приведена на рис. 9.6, *b*, но наиболее употребительной системой нумерации является система Фишера.

Замещенные порфины называют порфиринами. Порфирин — это любой макроциклический тетрапиррольный пигмент, в котором пиррольные кольца соединены метиновыми мостиками, а система двойных связей образует замкнутую коньюгированную (сопряженную) цепь. Считается, что у всех хлорофиллов

* В Россиской Федерации использование облучения для обработки пищевых продуктов запрещено. — *Примеч. ред.*

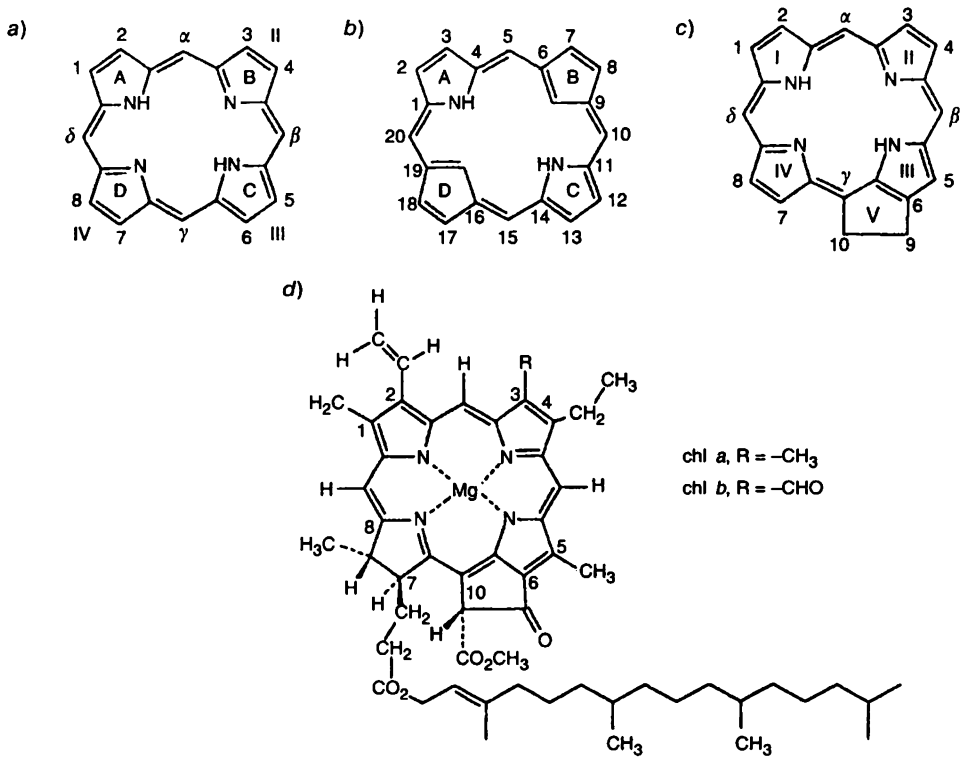


Рис. 9.6. Структуры порфина (*a*, *b*), форбина (c) и хлорофилла (chl) (*d*)

ядром является форбин (рис. 9.6, *c*), который образуется добавлением к порфину пятого изоциклического кольца (V). Хлорофиллы, следовательно, классифицируются как порфирины.

В природе встречается несколько видов хлорофилла. Их структуры различаются по заместителям (замещающим группам или атомам) вокруг форбинового ядра. Хлорофиллы *a* и *b* встречаются в зеленых растениях в примерном соотношении 3 1 и отличаются друг от друга углеродным заместителем при третьем атоме углерода (C3). В хлорофилле *a* содержится метильная группа, тогда как в хлорофилле *b* — формильная (рис. 9.6, *d*). У этих видов хлорофилла имеются винильная и этильная группы (соответственно, в положениях C2 и C4), карбометоксильная группа в положении C10 изоциклических колец и фитоловая группа, этерифицированная пропионатом в положении C7. Фитол представляет собой мононенасыщенный изопреноидный спирт с 20 атомами углерода. В морских водорослях, динофлагеллятах и диатомовых водорослях хлорофилл *c* (рис. 9.6, *d*) связан с хлорофиллом *a*. Основными хлорофиллами, обнаруженными в красных фотосинтезирующих и зеленых серных бактериях, являются, соответственно, бактериохлорофиллы и хлоробиум-хлорофиллы. Хлорофилл *d* является минорной составляющей, сопутствующей хлорофиллу *a* в красных водорослях. Для обозначения хлорофиллов и их производных широко используются тривиальные названия [69] (табл. 9.4). Схематическое представление структурных отношений хлорофилла и некоторых его производных представлено на рис. 9.7 [121].

9.2.2.2. Физические характеристики

Хлорофиллы локализованы в ламеллах внутриклеточных органелл (хлоропластов) зеленых растений и связаны с каротиноидами, липидами и липопротеинами слабыми нековалентными связями. Эти связи легко рвутся, благодаря чему хлорофиллы можно экстрагировать мацерированием (здесь —

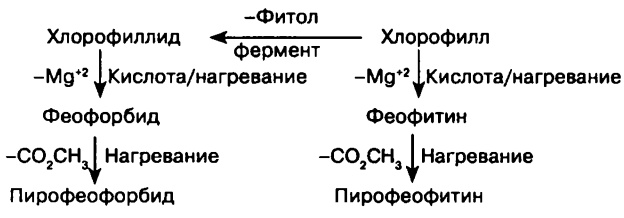


Рис. 9.7. Хлорофилл и его производные

Таблица 9.4
Тривиальные названия производных хлорофилла

Филлины	Магнийсодержащие производные хлорофилла
Феофитины	Производные хлорофилла, не содержащие магния
Хлорофиллиды	Производные, содержащие в положении С7 пропионовую кислоту, образующуюся в результате гидролиза фитилового эфира
Феофорбиды	Производные, содержащие в положении С7 пропионовую кислоту, являющуюся результатом удаления магния и гидролиза фитилового эфира
Метиловые или этиловые феофорбиды	Метиловый или этиловый эфиры, соответствующие 7-пропионату
Пиросоединения	Производные, в которых карбометоксигруппа в положении С10 замещена водородом
Мезосоединения	Производные, в которых винильная группа в положении С2 восстановлена до этиловой
Хлорины	Производные феофорбида *a*, образованные в результатом разрыва изоциклического кольца
Родины	Производные феофорбида *b*

настаиванием) растительной ткани в органических растворителях. Наиболее эффективны для полной экстракции хлорофиллов полярные растворители типа ацетона, метанола, этанола, этилацетата, пиридина и диметилформамида. Неполярные растворители типа гексана или петролейного эфира менее эффективны. Предпочтительным методом для разделения отдельных хлорофиллов и их производных в настоящее время является ВЭЖХ. В случае хлорофиллов *a* и *b*, например, увеличение полярности, обеспеченное С3-формильным заместителем хлорофилла *b*, заставляет его сильнее, чем хлорофилл *a*, адсорбироваться на нормально-фазовой колонке и слабее — на обращенно-фазовой [19, 37, 118].

Идентификация хлорофиллов и их производных основана преимущественно на характеристиках поглощения видимого света. Видимые спектры хлорофиллов *a* и *b* и их производных характеризуются отчетливыми полосами поглощения в красной области спектра в диапазоне длин волн 600–700 нм и в синей области 400–500 нм (табл. 9.5). Длины волн максимального поглощения для хлорофиллов *a* и *b*, растворенных в этиловом эфире, составляют, соответственно, 660,5 и 642 нм в красной области, 428,5 и 452,5 нм — в синей области [132]. В последнее время для выяснения структуры алломеров хлорофиллов и их производных, образующихся при переработке фруктов и овощей, используются методы масс-

Таблица 9.5
Спектральные свойства хлорофиллов *a* и *b* и их производных в этиловом эфире

Соединение	Максимальная длина волны светопоглощения, нм		Коэффицент поглощения (синий/красный)	Молярная экстинкция (красная область)
	Красная область спектра	Синяя область спектра		
Хлорофилл [a]	660,5	428,5	1,30	86,300[a]
Метилхлорофиллид [a]	660,5	427,5	1,30	83,00[b]
Хлорофилл [b]	642,0	452,5	2,84	56,100[a]
Метилхлорофиллид [b]	641,5	451,0	2,84	—[a]
Феофитин [a]	667,0	409,0	2,09	61,000[b]
Метилфеофорбид [a]	667,0	408,5	2,07	59,000[b]
Феофитин [b]	655	434	—	37,000[c]
Пирофеофитин [a]	667,0	409,0	2,9	49,000[b]
Цинк феофитин [a]	653	423	1,38	90,300[d]
Цинк феофитин [b]	634	446	2,94	60,200[d]
Медь феофитин [a]	648	421	1,36	67,900[d]
Медь феофитин [b]	627	438	2,53	49,800[d]

[a] Данные работы [132].
[b] Данные работы [109].
[c] Данные работы [27].
[d] Данные работы [74].

спектроскопии — химическая ионизация при атмосферном давлении (*APCI*) и ионизация методом электрораспыления (*ESI*) [65].

9.2.2.3. Модификации хлорофилла

9.2.2.3.1. Ферментная модификация

Единственным ферментом, катализирующим расщепление хлорофилла, является хлорофиллаза. Хлорофиллаза представляет собой эстеразу, которая *in vitro* катализирует отщепление фитола от хлорофиллов и не содержащих магния их производных (феофитинов), образуя, соответственно, хлорофиллиды и феофорбиды (рис. 9.7). Активность хлорофиллазы ограничивается порфиринами с карбометоксигруппами при С10 и атомах водорода в позициях С7 и С8 [98]. Этот фермент активен в водных, спиртовых и ацетоновых растворах. В присутствии больших количеств таких спиртов, как метанол или этанол, фитоловая группа отщепляется, и хлорофиллид этерифицируется с образованием либо метилового, либо этилового хлорофиллида соответственно. Образование хлорофиллидов в свежих листьях не происходит до тех пор, пока фермент не активируется тепловой обработкой после сбора урожая. Оптимальная температура для активности хлорофиллазы в овощах составляет 60–82,2 °С [88]. Активность хлорофиллазы уменьшается при нагревании растительной ткани до температур выше 80 °С и прекращается при температуре 100 °С. Активность хлорофиллазы в шпинате во время роста и хранения в свежем виде показана на рис. 9.8, причем максимальная ее активность соответствует началу цветения (на рисунке показана пунктиром). Хранение свежего шпината после сбора урожая при температуре 5 °С снижает активность этого фермента по сравнению со временем сбора урожая (на рисунке — сплошная линия) [122].



Рис. 9.8. Активность хлорофиллазы (процент превращения хлорофилла в хлорофиллид) в шпинате в процессе роста (пунктирная линия) и хранения при температуре 5 °С (сплошная линия). По [148]

9.2.2.3.2. Тепловая и кислотная модификация

Производные хлорофилла, образованные в ходе нагревания или тепловой обработки, по наличию или отсутствию атома магния в тетрапирроловом центре можно разделить на две группы, Производные с магнием имеют зеленый цвет, а производные, его не содержащие, — оливково-коричневатый. Последние являются хелаторами (хелирующими агентами), и в присутствии достаточного количества атомов цинка или меди они образуют с ними зеленые комплексы.

Первым наблюдаемым изменением при воздействии теплоты на молекулу хлорофилла является ее изомеризация. Изомеры хлорофилла образуются путем инверсии карбометоксигруппы в позиции С10, и их обозначают как *a'* и *b'* Они сильнее поглощаются на С18-обращеннофазовой колонке ВЭЖХ, чем исходные соединения, благодаря чему достигается четкое разделение. В нагретой растительной ткани или в органических растворителях изомеризация происходит быстро. В результате установления равновесия после нагревания в течение 10 мин при 100 °С в листьях происходит превращение 5–10% хлорофиллов *a* и *b* в формы *a'* и *b'* [5, 122, 151]. Об образовании изомеров во время нагревания свидетельствуют хроматограммы экстракта свежего шпината по сравнению с бланшированным (рис. 9.9).

Атом магния в хлорофилле легко замещается двумя атомами водорода, что приводит к образованию феофитина оливково-коричневатого цвета (рис. 9.10). В водном растворе эта реакция необратима. По сравнению с исходными соединениями феофитины *a* и *b* менее полярны и сильнее поглощаются на обращенно-фазовой колонке ВЭЖХ. Образование соответствующих феофитинов из хлорофилла *a* происходит быстрее, чем из хлорофилла *b* (последний более стоек к нагреванию, чем хлорофилл *a*). Более высокая стабильность хлорофилла *b* обусловлена эффектом отбора электрона из его С3-формильной группы. Перенос электронов из центра молекулы обусловлен конъюгированной структурой хлорофилла. Наблюдающееся в результате увеличение положительного заряда четырех пиррольных атомов азота уменьшает

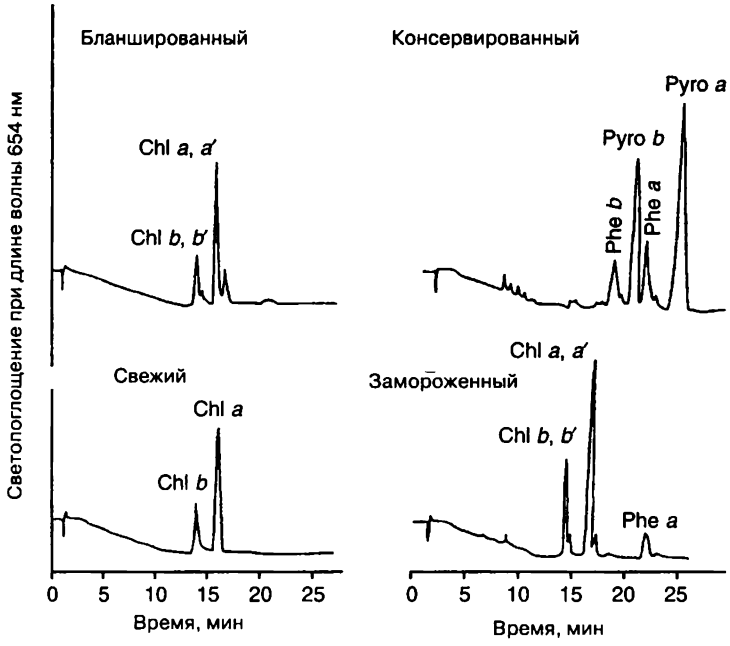


Рис. 9.9. Хроматограммы ВЭЖХ хлорофиллов (chl) и их производных в свежем, бланшированном, замороженном и консервированном шпинате: Phe — феофитин, Pyro — пирофеофитин. По [122]

константу равновесия для гидрогенизации пиррольного азота. По имеющимся данным энергия активации этой реакции варьирует от 12,6 до 35,2 ккал/моль, что обусловлено различиями в составе среды, значений pH и температурном интервале.

На деградацию хлорофилла в подвергнутых тепловой обработке растительных тканях влияет их значение pH. В щелочной среде (pH 9,0) хлорофилл очень стоек к действию теплоты, а в кислой (pH 3,0) он нестабилен. Снижение значения pH на одну единицу во время нагревания растительной ткани может происходить вследствие высвобождения кислот и оказывает негативное воздействие на скорость расщепления хлорофилла. Образование феофитина в неповрежденной (интактной) растительной ткани после сбора урожая сопровождается разрушением клеточной мембраны. В работе [58] показано, что расщепление хлорофилла в листьях сахарной свеклы, выдержанных в нагретом буферном растворе, не начинается до тех пор, пока температура не достигнет 60 °C и выше. Превращение хлорофилла в феофитин после выдержки в течение 60 мин при температурах 60 и 100 °C составляет, соответственно, 32 и 97%. Предполагается, что образование феофитина в растительных клетках подавляется из-за повышения способности ионов водорода при нагревании проходить через клеточные мембраны. Критическая температура для начала образования феофитина совпадает с явными изменениями в мембранной организации, заметными при электронной микроскопии.

Добавление хлористых солей натрия, магния или кальция снижает образование феофитина в листьях табака, нагретых до 90 °C, соответственно на 47, 70 и 77%. Было высказано предположение, что такое добавление катионов нейтрализует отрицательный поверхностный заряд жирных кислот и белка в мембране хлоропластов, уменьшая силы притяжения ионов водорода к поверхности мембраны [100].

На проницаемость мембраны для водорода может также влиять добавление детергентов (поверхностно-активных веществ), адсорбируемых на поверхности мембраны. Катионные детергенты отталкивают ионы водорода от поверхности мембраны, ограничивая их диффузию в клетку и уменьшая расщепление хлорофилла. Анионные детергенты, наоборот, притягивают ионы водорода, увеличивая их концентрацию на поверхности мембраны, повышая скорость диффузии водорода и увеличивая расщепление хлорофилла. В случае нейтральных детергентов отрицательный поверхностный заряд на мембране снижается, и притяжение ионов водорода и последующее расщепление хлорофилла уменьшаются [22,58].

Замещение C10-карбометоксильной группы феофитина атомом водорода приводит к образованию пирофеофитина оливкового цвета. Длины волн максимального светопоглощения пирофеофитином идентичны феофитину (как в красной, так и в синей областях спектра, см. табл. 9.5). Время удержания для пирофеофитинов *a* и *b*, используемое в обращеннофазовой ВЭЖХ, больше, чем для соответствующих феофитинов.

Модификация хлорофилла при нагревании происходит последовательно согласно следующей кинетической последовательности: хлорофилл → феофитин → пирофеофитин.

Из табл. 9.6 следует, что при нагревании в течение первых 15 мин содержание хлорофилла быстро снижается, а феофитина быстро возрастает. При дальнейшем нагревании содержание феофитина снижается и возрастает содержание пирофеофитина, хотя небольшие количества пирофеофитина заметны уже после

4 мин нагревания. Его накопление становится заметным только через 15 мин. Константа скорости реакции первого порядка для превращения феофитина *b* в пирофеофитин *b* на 25–40% больше той же константы для превращения феофитина *a* в пирофеофитин *a* [91]. Энергия активации для отщепления С10-карбометоксильной группы от феофитинов *a* и *b* меньше, чем энергия для образования феофитина *a* и *b* из хлорофилла *a* и *b*, что свидетельствует о более низкой температурной зависимости для образования пирофеофитинов из феофитинов.

Концентрации феофитинов *a* и *b* и пирофеофитинов *a* и *b* в промышленно выпускаемых консервированных овощах приведены в табл. 9.7. Из нее следует, что основными производными хлорофилла, обеспечивающими оливково-зеленый цвет многих консервированных овощей, являются феофитины *a* и *b*. Количество образующихся пирофеофитиновых производных является важным показателем жесткости тепловой обработки. Продолжительность тепловой обработки для обеспечения стерильности 303 банок промышленно выпускаемых шпината, зеленостручковой фасоли, нарезанной спаржи и зеленого горошка, стерилизуемых при температуре 121 °С, составила примерно 51, 11, 13 и 17 мин соответственно. Из табл. 9.7 следует, что содержание феофитина по сравнению с общим содержанием феосоединений составляет соответственно 84, 44, 38 и 49%. Это хорошо согласуется с длительностью нагревания.

Замещение атома магния в зеленом хлорофиллиде на ионы водорода приводит к образованию оливково-коричневатого феофорбида. Феофорбиды *a* и *b* более растворимы в воде, чем соответствующие феофитины, и имеют те же спектральные характеристики. На скорость потери магния тетрапиррольным центром, по-видимому, влияет отщепление С10-фитольной цепи. Скорость расщепления хлорофиллидов *a* и *b* и соответствующих метилового и этилового эфиров в подкисленном ацетоне возрастает по мере уменьшения длины цепи, что свидетельствует о воздействии С10-цепи как стерической преграды на скорость атаки ионов водорода [116].

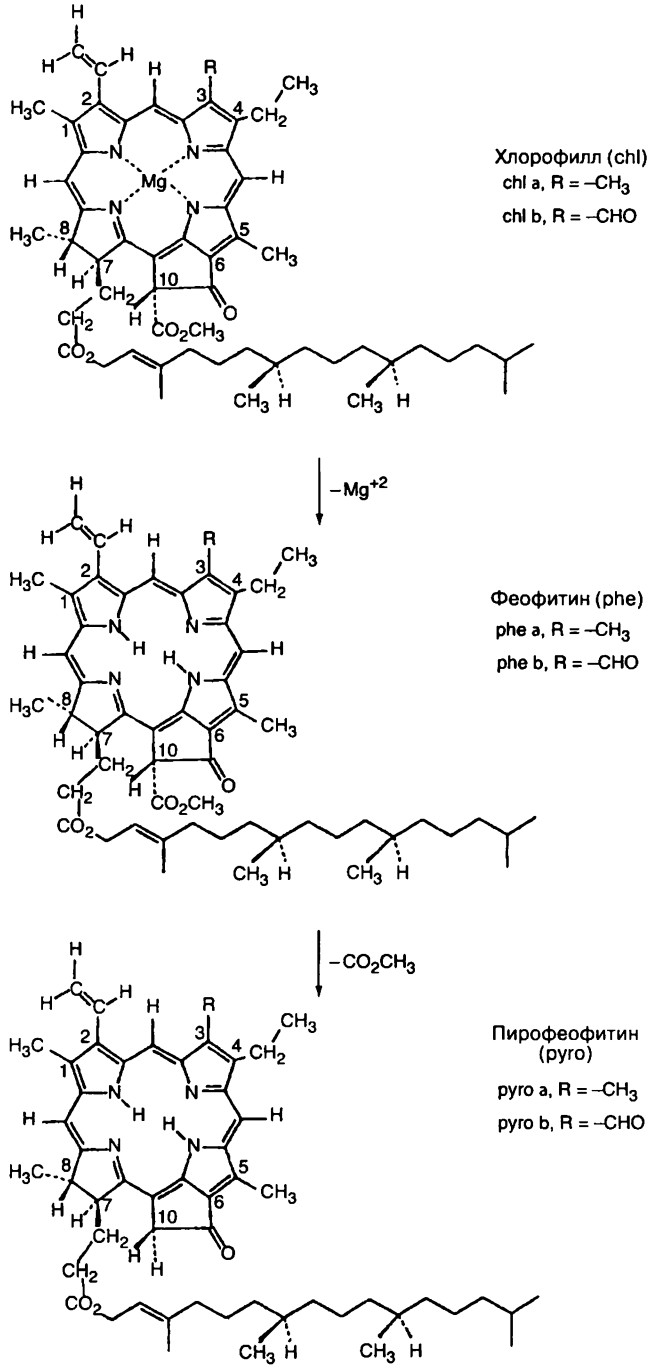


Рис. 9.10. Образование феофитина и пирофеофитина из хлорофилла

Исследования скорости реакций с использованием тканей зеленых растений в общем подтвердили мнение, что хлорофиллиды более термостойки, чем хлорофиллы, однако относительно недавно в работе [20] было показано, что верно противоположное — хлорофиллид *a* при температуре 145 °С расщеплялся в 3,7 раза быстрее, чем хлорофилл *a*. Более водорастворимый хлорофиллид, по всей видимости, контактирует с ионами водорода в растворе и, вероятно, быстрее вступает в реакцию. В настоящее время принято, что правильным является последний вывод, так

Таблица 9.6

Концентрация (мг/г сухой массы)[a] хлорофиллов, феофитинов и пирофеофитинов *a* и *b* в свежем, бланшированном и прошедшем тепловую обработку при 121 °С шпинате. По [90]

Тип шпината	Хлорофилл		Феофитин		Пирофеофитин		Значение pH[b]
	a	*b*	*a*	*b*	*a*	*b*	
Свежий	6,98	2,49					
Бланшированный	6,78	2,47				7,06	
Прошедший тепловую обработку за:							
2 мин[c]	5,72	2,46	1,36	0,13			6,90
4 мин[c]	4,59	2,21	2,20	0,29	0,12		6,77
7 мин[c]	2,81	1,75	3,12	0,57	0,35		6,60
15 мин[c]	0,59	0,89	3,32	0,78	1,09	0,27	6,32
30 мин[c]		0,24	2,45	0,66	1,74	0,57	6,00
60 мин[c]			1,01	0,32	3,62	1,24	5,65

[a] Расчетная погрешность ±2%; каждое значение представляет собой среднее по 3 определениям.

[b] Значение pH измерялось после обработки перед экстракцией пигмента.

[c] Приведенные периоды времени измерялись после достижения температуры 121 °С внутри продукта.

Таблица 9.7

Концентрация фео- и пирофеофитинов *a* и *b* в промышленно выпускаемых консервированных овощах. По [90]

Продукт	Феофитин, мкг/г сухой массы[a]		Пирофеофитин, мкг/г сухой массы	
	a	*b*	*a*	*b*
Шпинат	830	200	4000	1400
Бобы	340	120	260	95
Спаржа	180	51	110	30
Горох	34	13	33	12

[a] Расчетная погрешность ±2%.

как в указанной работе использовалась более чувствительная техника и хлорофиллаза была более полно активирована, благодаря чему для кинетических исследований были доступны большие количества хлорофиллидов.

9.2.2.3.3. Образование комплексов с металлами

Два атома водорода в тетрапиррольных ядрах производного хлорофилла, не содержащего магния, легко замещаются ионами цинка или меди с образованием комплексов с металлами, имеющих зеленый цыет. Образование таких комплексов из феофитинов *a* и *b* заставляет максимум светопоглощения в красной области сдвигаться в сторону более коротких волн, а в синей — в сторону более длинных (см. табл. 9.5) [74]. Спектральные характеристики комплексов с металлами, не содержащих фитол, идентичны их исходным соединениям.

Zn- и Cu-комплексы в кислых растворах более стабильны, чем в щелочных. Как мы уже отмечали, магний легко удаляется при комнатной температуре путем добавления кислоты, тогда как комплекс феофитина *a* с цинком стабилен в растворе при pH 2. Удаление меди достигается только при значениях pH, достаточно низких для начала расщепления порфиринового кольца.

Включение ионов металлов в нейтральный порфирин является бимолекулярной реакцией. Считается, что эта реакция начинается с присоединения иона металла к пиррольному атому азота, сопровождаемого незамедлительным отщеплением двух атомов водорода. На образование комплексов с металлами влияют также замещающие группы благодаря высокорезонансной структуре тетрапиррольных ядер [33].

Известно, что в растительной ткани образуются комплексы производных хлорофилла с металлами, причем *a*-комплексы образуются быстрее, чем *b*-комплексы. Более медленное образование последних относят на счет влияния С3-формильной группы, отбирающей электроны. Миграция электронов из конъ-

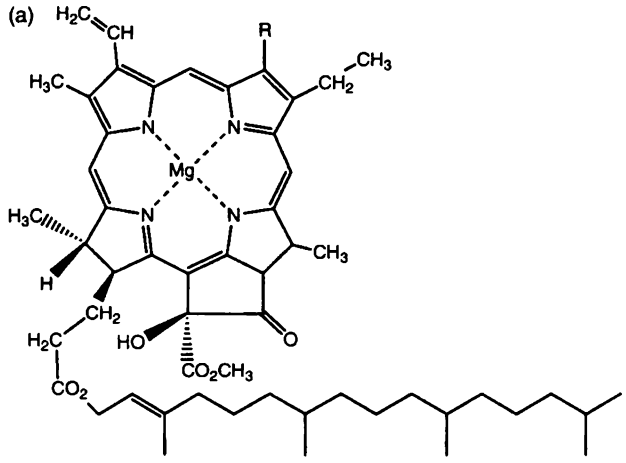
югированной системы порфиринового кольца увеличивает положительный заряд атомов пиррольного азота и, следовательно, делает их менее реакционноспособными относительно катионов металлов. Кроме того, скорость образования комплексов снижает стерический барьер фитольной цепи. Феофорбид *a* в этаноле реагирует с ионами меди в четыре раза быстрее, чем феофитин *a* [73].

Изучалась также кинетика образования комплексов с цинком. Быстрее всего происходит образование Zn^{2+}-пирофеофорбида *a* в смеси «ацетон/вода» (80/20), после чего следуют феофорбид *a*, метилфеофорбид *a*, этилфеофорбид *a*, пирофеофитин *a* и феофитин *a*. По мере того как возрастает длина алкильной цепи, этерифицированной в положении C7, скорости реакций уменьшаются, что позволяет сделать вывод о том, что здесь играет роль стерический барьер. Аналогичным образом более высокую скорость образования Zn-пирофеофитина *a* по сравнению с феофитином *a* относят на счет стерических затруднений создаваемых C10-карбометаксильной группой феофитина *a* [109, 142].

Сравнительные исследования образования комплексов с металлами в овощных пюре свидетельствуют, что медь образует хелатные комплексы быстрее, чем цинк. Комплексы меди обнаруживаются в гороховом пюре уже при концентрации меди 1–2 мг/кг, тогда как образование комплексов с цинком в пюре, содержащих менее 25 мг Zn^{2+}/кг, не происходит. В присутствии и Zn^{2+}, и Cu^{2+} преобладает образование комплексов с медью [117].

На скорость образования комплексов влияет и значение pH. Увеличение pH пюре из шпината с 4,0 до 8,5 приводит к 11-кратному увеличению содержания Zn-пирофеофитина *a*, образующегося в ходе стерилизации при 121 °C в течение 60 мин. Снижение скорости образования комплексов с металлами наблюдается при увеличении значения pH до 10, по-видимому, из-за осаждения Zn^{2+} [81].

Эти хелатные комлексы с металлами представляют особый интерес, так как в странах ЕС комплексы меди из-за их стабильности в типичных технологических условиях производства пищевых продуктов широко применяются как окрашивающие вещества (в США подобная технология не разрешена). Процесс модификации зеленого цвета консервированных овощей основан именно на образовании хелатных комплексов с цинком.



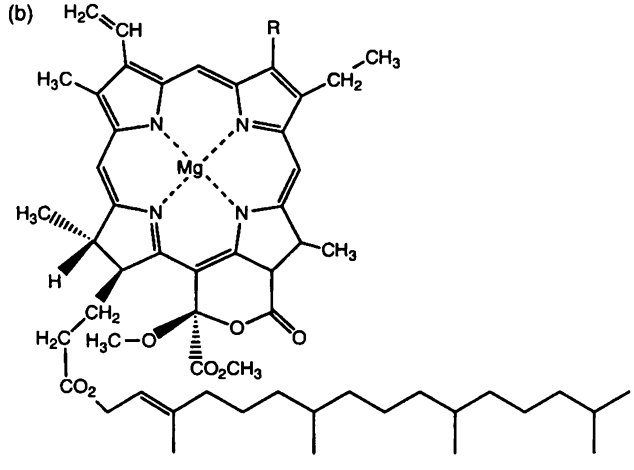


Рис. 9.11. Структура 10-гидроксихлорофилла (*a*) и 10-метоксилактона хлорофилла (*b*)

9.2.2.3.4. Алломеризация

Хлорофиллы окисляются, когда они растворены в спирте или других растворителях и подвергаются воздействию воздуха, и этот процесс называется алломеризацией. Он обусловлен поглощением кислорода, эквимолярного по количеству соответствующим хлорофиллам [125]. В ходе этой реакции продукты приобретают сине-зеленый цвет и не дают желто-коричневого кольца в фазовом тесте Молиша (*Molisch*) [60]. Отсутствие этой цветной реакции свидетельствует, что циклопентаноновое кольцо (кольцо V из рис. 9.6, *c*) было окислено или что была отщеплена карбометоксильная группа при C10. Продукты алломеризации были идентифицированы как 10-гидроксихлорофиллы и 10-метоксилактоны (рис. 9.11). Основной продукт алломеризации хлорофилла *b* — это 10-метоксилактон.

9.2.2.3.5. Фотодеградация

Во время фотосинтеза в здоровых растительных клетках хлорофилл защищен от фотодеградации окружающими его каротиноидами и липидами. Хлорофилл может действовать как сенсибилизатор, образуя синглетный кислород, а каротиноиды его «гасят» и защищают растение от фотодеградации. Как только в результате старения растения, экстракции пигмента из ткани или повреждения клеток в процессе переработки эта защита утрачивается, хлорофиллы становятся восприимчивыми к фотодеградации [86, 87]. В присутствии света, кислорода, а также при их сочетании хлорофиллы необратимо обесцвечиваются.

Идентифицировать бесцветные продукты фотодеградации хлорофиллов пытались многие исследователи. Так, в работах [71, 72] был идентифицирован метилэтилмалеимид, а в работах [86, 87] было показано, что основным продуктом распада хлорофиллов является глицерин наряду с небольшими количествами молочной, лимонной, янтарной и яблочной (малоновой) кислот, а также аланина. Прореагировавшие пигменты оказались полностью обесцвеченными.

Считается, что фотодеградация хлорофилла приводит к раскрытию тетрапиррольного кольца и его фрагментации на соединения с более низкой молекулярной массой. Было высказано предположение, что фотодеградация начинается с размыкания кольца при одном из метиновых мостиков с образованием окисленных линейных тетрапирролов [134]. Известно, что при воздействии на хлорофиллы или соответствующие порфирины света в присутствии кислорода образуются синглетный кислород и гидроксильные радикалы [39]. Сразу после их образования они вступают в реакцию с тетрапирролами с образованием пероксидов и еще большего количества свободных радикалов, что неизбежно ведет к распаду порфиринов и полному обесвечиванию.

9.2.2.4. Обесцвечивание в ходе тепловой обработки

Потеря зеленого цвета у термически переработанных овощей является результатом образования феофитина и пирофеофитина. В ходе бланширования и промышленной стерилизации содержание хлорофилла снижается на 80–100% [122]. Свидетельством того, что во время бланширования перед стерилизацией образуется небольшое количество феофитина, могут служить хроматограммы, приведенные на рис. 9.9. Увеличение содержания феофитина в замороженном шпинате по сравнению с бланшированным может быть отнесено на счет более жесткого режима бланширования, обычно применяемого для подлежащих замораживанию овощей. Одна из главных причин бланширования шпината перед его консервированием связана с необходимостью размягчить растительную ткань и облегчить упаковку, тогда как бланширование перед замораживанием должно быть достаточным не только для размягчения ткани, но и для инактивации ферментов. Состав красящих веществ в консервированном образце свидетельствует, что хлорофиллы полностью превратились в феофитины и пирофеофитины.

Деградация хлорофилла в растительных тканях после сбора урожая инициируется декомпартментализацией клеточных кислот после начала нагревания, а также синтезом новых кислот [58]. В овощах идентифицировано несколько таких кислот, в том числе щавелевая, яблочная, лимонная, уксусная, янтарная и пирролидоновая карбоновая кислота (ПКК). Считается, что главной причиной повышения кислотности овощей при нагревании является термическая деградация глютамина с образованием ПКК [23]. К другим факторам, способствующим повышению кислотности, можно отнести жирные кислоты, образующиеся при гидролизе липидов, сероводород, высвобождающийся из белков и аминокислот, а также диоксид углерода, продуцируемый при реакциях неферментативного потемнения. Снижение значения pH в ходе тепловой обработки пюре из шпината приведено в табл. 9.6.

9.2.2.5. Способы сохранения цвета

Основные усилия по сохранению зеленого цвета консервированных овощей были направлены на сохранение хлорофилла и его зеленых производных (хлорофиллидов), а также на обеспечение приемлемого зеленого цвета путем образования их хелатных комплексов с металлами.

9.2.2.5.1. Нейтрализация кислот

Добавление к консервированным зеленым овощам подщелачивающих веществ зачастую помогает повысить сохранность хлорофиллов в ходе переработки. Для этого, чтобы сохранить pH продукта или повы-

сить его до 7,0, в воду для бланширования добавляют окись кальция или натрия дигидрофосфат. Кроме того, в этих целях пробуют использовать карбонаты магния или натрия в сочетании с фосфатом натрия, однако при этом растительная ткань размягчается и появляется щелочной привкус.

В 1940 г. в работе[10] удалось выявить упрочняющий эффект кальция и магния при их добавлении к овощам, что привело к использованию гидроксидов кальция или магния в целях повышения pH и сохранения текстуры овощей (такая сочетанная обработка известна как «процесс Блера (*Blair*). Попытки промышленного использования этого процесса к успеху не привели из-за неспособности этих подщелачивающих веществ эффективно нейтрализовать внутритканевые кислоты на длительное время и не позволили избежать значительного обесцвечивания в течение менее 2 мес. хранения.

Еще один способ касается покрытия внутренней поверхности упаковки (банки) этилцеллюлозой, содержащей 5% гидроокиси магния. Декларируется, что медленное выщелачивание окиси магния с внутренней поверхности упаковки поддерживает значение pH на уровне около 8,0 в течение длительного времени и помогает стабилизировать зеленый цвет [93, 94]. Эти способы оказались успешными лишь частично, поскольку повышение pH консервированных овощей может вызывать гидролиз таких амидов, как глютамин или аспарагин, с образованием нежелательного аммиачного запаха. Кроме того, жирные кислоты, образующиеся при гидролизе липидов в ходе бланширования в условиях высоких значений pH, могут окисляться с образованием привкуса прогорклости. У зеленого горошка высокие значения pH (8,0 и выше) могут стать причиной образования струвитов — стеклоподобных кристаллов, состоящих из комплекса магния и фосфата аммония. Считается, что струвит образуется при реакции магния с аммонием, образующимся из белка горошка при нагревании.

9.2.2.5.2. Кратковременная высокотемпературная обработка

В промышленно стерилизованных пищевых продуктах, стерилизуемых при более высокой температуре, чем обычно, и за более короткое время (*HTST*), зачастую лучше сохраняются витамины, вкус и цвет. Это обусловлено тем, что их деградация больше зависит от температуры, чем инактивация спор *C. botulinum*. Температурную зависимость выражают через *z*-показатель или энергию активации. *Z*-показатель отражает изменение температуры (°C), необходимое для десятикратного изменения скорости деградации. Установлено, что этот *z*-показатель для образования феофитинов *a* и *b* в стерилизуемом пюре из шпината составляет соответственно 51 и 98 °C [56]. Более высокие значения по сравнению с его значением для унитожения спор *C. botulinum* ($z = 10$ °C) позволяют лучше сохранять цвет при использовании *HTST*-обработки [120]. Тем не менее, это преимущество кратковременной высокотемпературной обработки через 2 мес. хранения утрачивается (предположительно из-за снижения значения pH продукта при хранении) [90, 138].

HTST-обработку растительных тканей иногда комбинируют с регулированием значения pH. Обработанные образцы имели более зеленый цвет и в них содержалось больше хлорофилла, чем в контрольных образцах, однако улучшение цвета, как мы уже отмечали, во время хранения нивелируется [16, 56].

9.2.2.5.3. Ферментативное превращение хлорофилла в хлорофиллиды

Для лучшего сохранения цвета в зеленых овощах предлагается бланширование при более низких температурах, чем обычно применяемые для инактивации ферментов. Образующиеся при этом хлорофиллиды более термостойки, чем исходные соединения. Исследования показали, что при бланшировании шпината для консервирования при 71 °C в течение 20 мин цвет сохраняется лучше. Это характерно для температур бланширования от 54 до 76 °C. Был сделан вывод, что причиной сохранения цвета переработанного шпината, бланшированного при низких температурах (65 °C, до 45 мин) является превращение хлорофилла в хлорофиллиды под действием фермента хлорофиллазы [88]. Вместе с тем улучшение цвета, достигаемое таким способом, оказалось недостаточным для промышленного внедрения этой технологии [22].

Превращение хлорофилла в хлорофиллиды в листьях шпината при тепловой обработке показано на рис. 9.12. В экстракте небланшированного шпината содержались только хлорофиллы *a* и *b*. Активация хлорофиллазы в шпинате, бланшированном при 71 °C, обусловливает образование хлорофиллидов (рис. 9.12, *b*), тогда как отсутствие почти всех хлорофиллидов в шпинате, бланшированном при 88 °C, является следствием инактивации этого фермента. На рис. 9.12 показана также точка, в которой проис-

ходит изомеризация хлорофилла во время нагревания, в виде нового пика, соответствующего изомеру хлорофилла *a* (рис. 9.12, *b* и *c*) [148].

9.2.2.5.4. Промышленное применение металлокомплексов

Современные попытки улучшить цвет зеленых овощей после переработки и получить хлорофиллы, которые можно бы использовать как пищевые красящие вещества, сводятся к использованию комплексов производных хлорофилла либо с цинком, либо с медью. Комплексы феофитина и феофорбида с медью промышленно выпускаются под названиями соответственно «медный комплекс хлорофилла» и «медный комплекс хлорофиллина». В США эти производные хлорофилла к использованию в пищевых продуктах не разрешены, тогда как в большинстве стран ЕС* их разрешено использовать в производстве консервированных продуктов, супов, молочных продуктов и конфет. Безопасность их применения в пищевых продуктах подверждена ФАО при условии, что содержание свободной ионизируемой меди в красителе составляет не более 200 мг/кг.

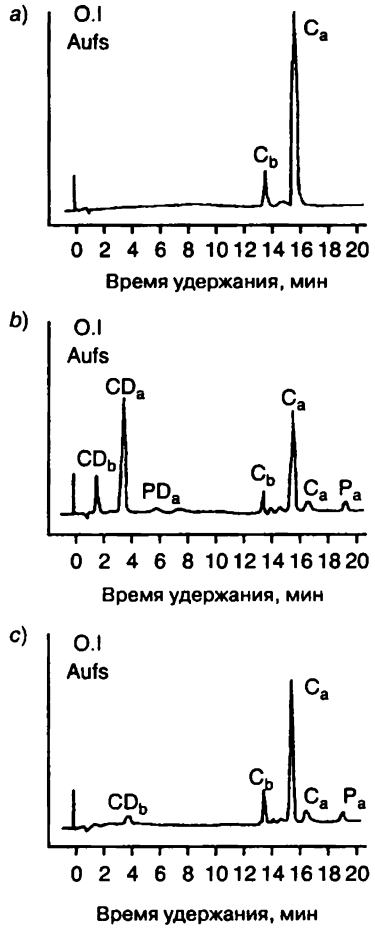


Рис. 9.12. Хлорофилл и производные хлорофилла шпината: *a* — небланшированного; *b* — бланшированного в течение 3 мин при 71 °С; *c* — бланшированного в течение 3 мин при 88 °С: C_a — хлорофилл *a* (различные значения времени удержания соответствуют изомерным формам); C_b — хлорофилл *b*; P_a — феофитин *a*, CD_a — хлорофиллид *a*, CD_b — хлорофиллид *b*; PD_a — феофорбид *a*; Aufs (*Absorbance Unites on the Full Scale*) — единицы поглощения по полной шкале, в которых определяется чувствительность детектора по электропроводности для систем ВЭЖХ). По [148]

Промышленное производство медных комплексов хлорофиллов описано в работе [63]. Хлорофилл экстрагируют из сушеной травы или люцерны с помощью ацетона или хлорированных углеводородов. В зависимости от содержания влаги в растительном материале добавляют количество воды, достаточное для проникновения растворителя, одновременно стараясь избежать активации хлорофиллазы. Некоторые феофитины при экстрации образуются спонтанно. Для образования маслорастворимого медного комплекса хлорофилла добавляют ацетат меди. В качестве альтернативы феофитин перед добавлением ионов меди можно подвергнуть кислотному гидролизу, в результе чего образуется водорастворимый медный комплекс хлорофиллина (пирофеофитина). Такие медные комплексы более стабильны, чем соответствующие комплексы с магнием: например, через 25 ч при температуре 25 °С расщепляется 97% хлорофилла (по сравнению с рсщеплением 44% его медного комплекса).

9.2.2.5.5. Реверсия зеленого цвета у овощей после тепловой обработки

Путем наблюдений установлено, что при промышленной стерилизации овощных пюре в них иногда образуются небольшие ярко-зеленые зоны, в которых содержатся цинк и медь. Такое образование ярко-зеленых зон в овощных пюре получило название «реверсия зеленого цвета» («вторичное позеленение»). У овощных продуктов промышленной переработки оно наблюдается в тех случаях, когда ионы цинка и/или меди присутствуют в рабочих растворах. Если обрабатывать окру (бамию) в рассоле (концентрированном соляном растворе), содержащем хлорид цинка, то

* И в Российской Федерации. — *Примеч. науч. ред.*

она сохраняет свой ярко-зеленый цвет за счет образования комплексов производных хлорофилла с цинком [38, 135, 137].

Фирмой *Continental Can Company* (в настоящее время — *Crown Cork & Seal Company*) был получен патент на технологию промышленного консервирование овощей с использованием солей металлов в растворе для бланширования или в рассоле. При этом овощи бланшируют в воде, содержащей достаточные количества солей Zn^{2+} или Cu^{2+}, благодая чему повышается концентрация ионов металлов до 100–200 мг/кг. Непосредственное добавление хлорида цинка в рассол для консервирования существенно не влияет на цвет овощей (зеленостручковой фасоли и зеленого горошка). Декларируется, что зеленые овощи, обработанные в такой модифицированной воде для бланширования, более зеленые, чем овощи, обработанные по традиционной технологии. Другие двух- и трехвалентные ионы металлов обычно менее эффективны или вообще не эффективны [126]. Данный способ получил название *Veri-Green*. Пигменты, присутствующие в зеленостручковой фасоли, консервированной по технологии *Veri-Green*, идентифицированы как комплексы феофитина и пирофеофитина с цинком [147].

Промышленная переработка зеленостручковой фасоли и шпината с применением цинка в настоящее время ведется несколькими фирмами, но результаты для разных овощей весьма неоднозначны. Последовательность изменений в содержании пигмента при нагревании горохового пюре в присутствии 300 мг Zn^{2+}/кг показана на рис. 9.13. Сождержание хлорофилла *a* снижается до следовых уровней лишь после 20 мин нагревания. Это снижение сопровождается образованием комплексов фео- и пирофеофитина *a* с цинком. Дальнейшее нагревание повышает концентрацию последнего за счет снижения содержания первого. Кроме того, комплекс пирофеофитина с цинком может образовываться путем декарбоксиметилирования комплекса феофитина с цинком или реакцией пирофеофитина с Zn^{2+} Это позволяет сделать вывод, что зеленый цвет овощей, обработанных в присутствии цинка, в значительной степени обусловлен присутствием комплекса пирофеофитина с цинком.

Предполагаемая последовательность реакций при превращении хлорофилла *a* в цинк-пирофеофитин *a* приведена на рис. 9.14. Образование Zn-комплексов быстрее всего происходит при pH 4,0–6,0, и значительно снижается при pH 8,0. Причина этого снижения в том, что при высоких значениях pH хлорофилл сохраняется, тем самым ограничивая количество производных хлорофилла, доступных для образования комплекса (рис. 9.15) [82,83]. Показано, что на образование комплекса с цинком может влиять присутствие анионных ПАВ, которые адсорбируются на мембранах хлоропластов, повышая отрицательный поверхностный заряд и тем самым способствуя образованию хелатных комплексов.

В настоящее время наилучшей технологией для получения желаемого зеленого цвета консервированных овощей является добавление цинка в раствор для бланширования, что увеличивает проницаемость

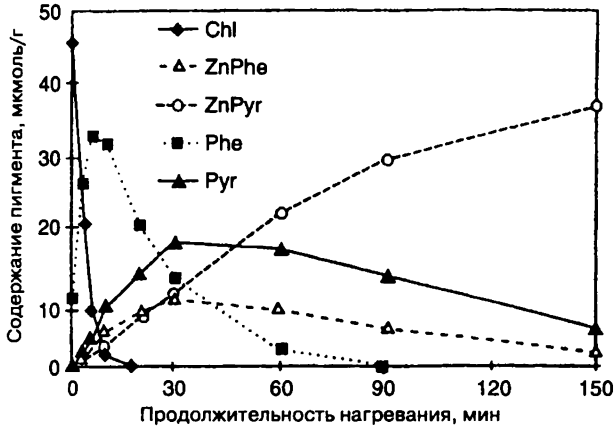


Рис. 9.13. Пигменты горохового пюре, содержащего 300 мг Zn^{2+}/кг после стерилизации при 121 °C: Chl — хлорофилл; ZnPhe — комплекс феофитина с цинком; ZnPyr — комплекс пирофеофитина с цинком; Phe — феофитин; Pyr — пирофеофитин. По [148]

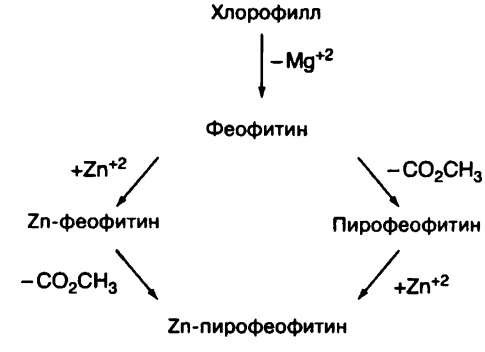


Рис. 9.14. Химические реакции при тепловой обработке зеленых овощей, содержащих цинк

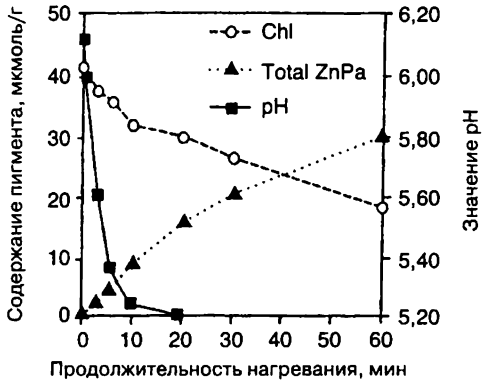


Рис. 9.15. Превращение хлорофилла *a* (chl) в комплексы цинка (ZnPa) и изменения pH горохового пюре, стерилизованном при 121 °С. По [58]

мембран растительной ткани в ходе предварительного нагревания перед бланшированием при температуре 60 °С и несколько выше, а также выбор такого значения pH, которое благоприятствует образованию металлокомплексов. Можно также использовать анионы, изменяющие поверхностный заряд растительной ткани.

9.2.3. Каротиноиды

Каротиноиды являются наиболее распространенными природными пигментами, причем годовое производство биомассы с каротиноидами оценивается в 100 млн т. Большинство этих пигментов является продуктом биосинтеза океанических водорослей. У высших растений каротиноиды в хлоропластах зачастую маскируются преобладающими хлорофилловыми пигментами. Осенью, когда хлоропласты разлагаются в ходе старения растений, желто-оранжевый цвет каротиноидов становится более выраженным [7].

Известно, что в растительных тканях каротиноиды выполняют важные функции в фотосинтезе и фотопротекции [53]. Во всех содержащих хлорофилл тканях каротиноиды участвуют в получении световой энергии как вспомогательные пигменты. Фотозащитная роль каротиноидов обусловлена их способностью подавлять формы кислорода (в частности, синглетный кислород), образующиеся под действием света и воздуха. Кроме того, особые каротиноиды корней и листьев являются предшественникам абсцизовой кислоты (соединения, действующего как переносчик химической информации и регулятор роста) [28, 105].

Наиболее важной ролью каротиноидных пигментов в рационе людей и животных является то, что они выступают прекурсором (предшественником) витамина А. Хотя наиболее высокой активностью провитамина А обладает β-каротин (благодаря двум β-иононовым кольцам, рис. 9.16), активностью провитамина А обладают и другие употребляемые в пищу каротиноиды, в частности, α-каротин и β-криптоксантин. Каротиноиды фруктов и овощей, обладающие активностью провитамина А, обеспечивают от 30 до 100% потребности человека в витамине А. Предварительным условием для активности витамина А является наличие у каротиноида ретиноидной структуры (с β-иононовым кольцом), то есть провитаминной активностью обладают лишь некоторые каротиноиды. Подробнее этот вопрос рассмотрен в главе 7.

В 1981 г. были получены эпидемиологические данные [111], что потребление фруктов и овощей с высоким содержанием каротиноидов обусловливает снижение у людей встречаемости специфических видов

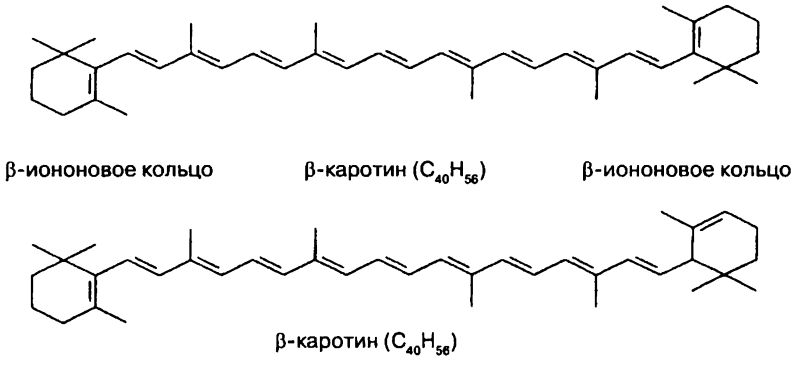
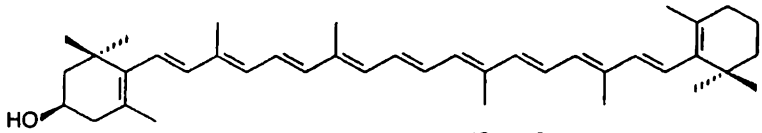
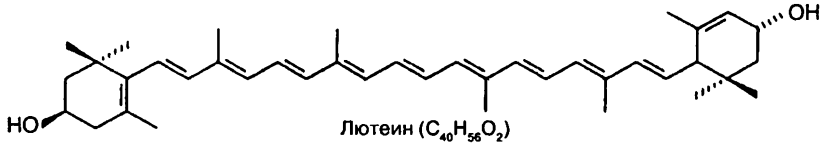


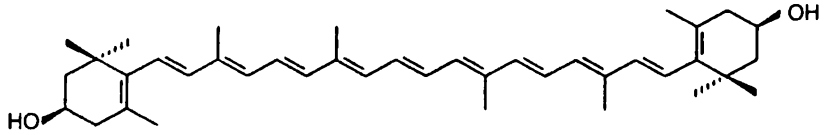
Рис. 9.16. Структуры наиболее распространенных каротиноидов. Лютеин (желтого цвета) присутствует в зеленых листьях, зерне и лепестках бархатцев; зеаксантин (желтого цвета) — в зерне и шафране; β-криптоксантин (желтого цвета) — в зерне; β-каротин (желтого цвета) — в моркови и батате; неоксантин (желтого цвета) — в зеленых листьях; капсантин (красного цвета) — в сладком красном перце; виолаксантин (желтого цвета) — в зеленых листьях; биксин (желтого цвета) — в семенах аннатового дерева



β-криптоксантин ($C_{40}H_{56}O$)



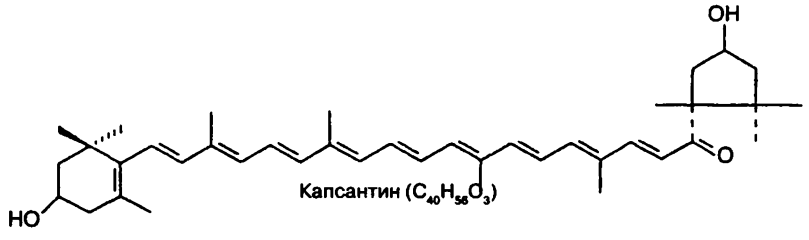
Лютеин ($C_{40}H_{56}O_2$)



Зеаксантин ($C_{40}H_{56}O_2$)



Неоксантин ($C_{40}H_{56}O_4$)



Капсантин ($C_{40}H_{56}O_3$)



Волаксантин ($C_{40}H_{56}O_4$)



Биксин ($C_{25}H_{30}O_4$)

Рис. 9.16 (окончание)

онкологических заболеваний. Позднее интерес сфокусировался на присутствии каротиноидов в рационе и на их физиологической значимости. Все это стимулировало существенное увеличение числа работ по каротиноидам (обзор работ по воздействию каротиноидов на здоровье и заболеваемость приведен в работе [79]).

9.2.3.1. Структура каротиноидов

Каротиноиды по своей структуре делятся на две группы — углеводородные каротины и окисленные ксантофиллы. Последние состоят из множества производных, содержащих зачастую гидроксильные, альдегидные, эпокси- и кетогруппы. Кроме того, в природе распространены жирнокислотные эфиры окисленных каротиноидов. В настоящее время идентифицировано более 700 каротиноидных структур [14], причем с учетом геометрических изомеров в виде *цис-* (*Z*) или *транс-* (*E*) форм возможно намного больше конфигураций.

В основной структурной цепи (каркасе) каротиноидов содержатся изопреновые единицы, ковалентно связанные либо «голова к хвосту», либо «хвост к хвосту», образуя тем самым симметричную молекулу (см. рис. 9.17). Из этой основной структуры из 40 атомов углерода получаются другие каротиноиды. В некоторых структурах присутствуют циклические концевые группы (см. формулу β-каротина на рис. 9.16), тогда как в других может быть как одна циклизация, так вообще ни одной (см. формулу ликопина, известного красного пигмента томатов, рис. 9.17). У других каротиноидов могут быть более короткие углеродные каркасы (их называют апокаротиналями, см. формулу биксина). Несмотря на то что существуют особые правила для именования и нумерации каротиноидов [66, 67], повсеместно в ходу тривиальные названия, которые мы и будем использовать в тексте.

Наиболее распространенным каротиноидом в растительных тканях является β-каротин, который используют и как красящее вещество в производстве пищевых продуктов. К пищевым продуктам можно добавлять как нативные, так и синтетические формы β-каротина. Структурные формулы некоторых каротиноидов растений приведены на рис. 9.16. К таким каротиноидам относятся α-каротин (в моркови), капсантин (в красном сладкам перце и паприке), лютеин, диол α-каротина и его эфиры (в лепестках бархатцев) и биксин (в семенах аннатового дерева). К другим распространенным каротиноидам пищевых

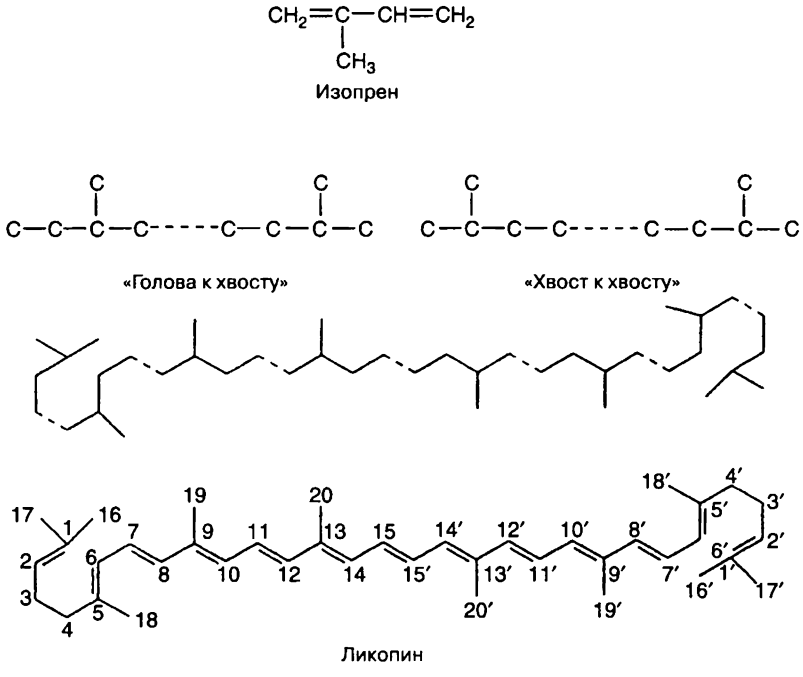


Рис. 9.17. Соединения изопреноидных блоков в ликопине, основном красном пигменте томатов. По [39]

продуктов относятся зеаксантин (диол β-каротина), виолаксантин (эпоксидный каротиноид), неоксантин (алленовый триол) и β-криптоксантин (гидроксилированное производное β-каротина).

У животных каротиноидные пигменты образуются в результате потребления растительных материалов, содержащих каротиноиды. Например, розовый цвет лососины обусловлен присутствием астаксантина, потребляемого с морскими растениями, содержащими каротиноиды. Хорошо известно, что некоторые каротиноиды и у растений, и у животных связаны или ассоциированы с белками. Красный пигмент астаксантин наружного скелета креветок и омаров при связи с белками дает голубую окраску. При нагревании этот комплекс денатурирует, так что спектроскопические и визуальные характеристики пигмента меняются, а цвет от голубого становится красным. Примерами комплекса «каротиноид-хлорофилл-белок» могут служить ововердин (зеленый пигмент, присутствующий в икре омаров) и комплекс «каротиноид-хлорофилл-белок» в хлоропластах растений. К другим специфическим структурам можно отнести каротиноидные гликозиды, встречающиеся у бактерий и прочих микроорганизмов. Примером каротиноидного гликозида растений может служить каротиноид кроцин, присутствующий в шафране.

9.2.3.2. Распространенность

В съедобных растительных тканях каротиноиды очень распространены [55] — ими богаты красные, желтые и оранжевые плоды и корнеплоды (ягоды, фрукты и овощи). К наиболее известным примерам богатых каротиноидами овощам относятся томаты (ликопин), морковь (α- и β-каротин), красный сладкий перец (капсантин), тыква, кабачок и патиссон (β-каротин) и батат (β-каротин), а также такая зерновая культура, как кукуруза (лютеин и зеаксантин). Каротиноиды присутствуют во всех зеленых листовых овощах, но их цвет маскируется зеленым хлорофиллом. Обычно наиболее высокие концентрации каротиноидов характерны для тех тканей, в которых содержится наибольшее количество хлорофилловых пигментов. Например, богаты каротиноидами шпинат и капуста, высокие их концентрации характерны для гороха, зеленостручковой фасоли и спаржи.

На содержание каротиноидов в растениях влияют самые разные факторы. В некоторых плодах их содержание резко меняется по мере созревания. Например, у томатов в ходе созревания содержание каротиноидов (особенно ликопина) существенно возрастает, то есть их концентрация зависит от стадии спелости. Каротиноиды томатов продолжают синтезироваться даже после сбора урожая, так как биосинтез каротиноидов стимулируется действием света. К другим факторам, влияющим на наличие и содержание каротиноидов, относятся климатические условия, применение пестицидов и удобрений, а также тип почвы [55].

9.2.3.3. Физические свойства, экстракция и анализ

Все классы каротиноидов — углеводороды каротины и ликопин и окисленные ксантофиллы — представляют собой липофильные соединения, так что они растворимы в жирах и органических растворителях [27]. Они умеренно стойки к нагреванию и предрасположены к обесцвечиванию в результате окисления. Каротиноиды можно легко изомеризовать нагреванием, кислотой или светом. Поскольку их цвет варьирует от желтого до красного, то определение длин волн для мониторинга каротиноидов обычно происходит в диапазоне длин волн примерно от 430 до 480 нм. Для некоторых ксантофиллов обычно используют более высокие длины волн для предотвращения влияния помех от хлорофиллов, причем многие каротиноиды после реакции с различными реагентами имеют спектральный сдвиг (эти изменения спектра помогают идентификации).

Сложная природа и разнообразие каротиноидных соединений, присутствующих в пищевых продуктах растительного происхождения, обусловливают необходимость хроматографического разделения [119]. В процедурах экстракции каротиноидов из растительной ткани используют органические растворители, которые должны проникать в гидрофильный матрикс. Для этой цели повсеместно используют гексан-ацетоновые смеси, но иногда для достижения удовлетворительного разделения приходится применять специальные растворители и методы обработки [75].

Для разделения каротиноидов разработаны различные хроматографические процедуры, включая методы ВЭЖХ [25, 32, 124, 139]. Особо сложные аналитические проблемы связаны с разделением и идентификацией эфиров каротиноидов, *цис*- и *транс*-изомеров, а также оптических изомеров.

9.2.3.4. Химические свойства

9.2.3.4.1. Окисление

Из-за большого количества конъюгированных двойных связей каротиноиды легко окисляются. Реакции окисления в пищевых продуктах приводят к обесцвечиванию каротиноидов и являются основными заслуживающими внимания механизмами их расщепления. Стойкость того или иного пигмента к окислению очень зависит от его окружения. Внутри тканей пигменты зачастую компартментализованы и тем самым защищены от окисления, однако физическое повреждение ткани или экстракция каротиноидов повышает их чувствительность к окислению. Более того, хранение каротиноидных пигментов в органических растворителях зачастую ускоряет расщепление. Из-за высоко конъюгированной ненасыщенной структуры каротиноидов продукты их расщепления очень сложны и преимущественно не описаны (за исключением β-каротина). Различные продукты расщепления β-каротина в ходе окисления и тепловой обработки показаны на рис. 9.18. При окислении сначала образуются эпоксиды и карбонильные соединения. Дальнейшее окисление приводит к образованию низкомолекулярных моно- и диоксигенированных соединений, в том числе эпокси-β-ионона. Обычно эпоксиды образуются прежде всего внутри концевых колец, а окислительное расщепление может происходить на самых разных участках цепи. У каротиноидов, обладающих активностью провитамина А, образование эпоксидов в кольце приводит к утрате провитаминной активности. Обширное автоокисление обычно приводит к обесцвечиванию каротиноидных пигментов и потере цвета. В присутствии сульфита и ионов металлов окислительное разложение β-каротина ускоряется [110].

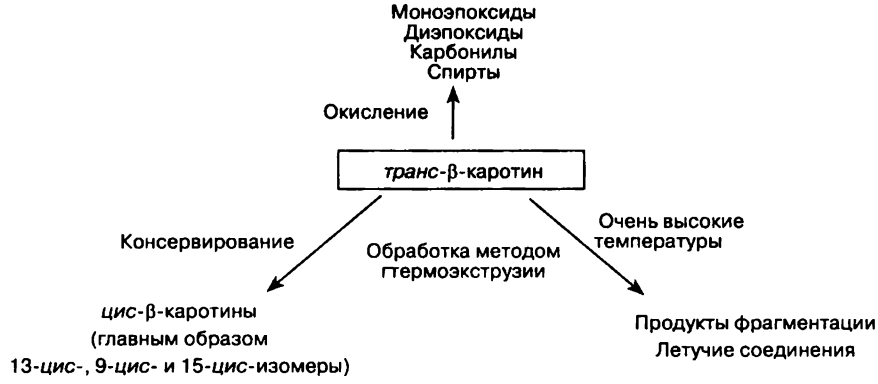


Рис. 9.18. Деградация *транс*-β-каротина

Активность ферментов (особенно липоксигеназы) ускоряет окислительное разложение каротиноидных пигментов. Это происходит косвенным образом — липоксигеназа сначала катализирует окисление ненасыщенных или полиненасыщенных жирных кислот с образованием пероксидов, которые, в свою очередь, быстро вступают в реакцию с каротиноидными пигментами. Такая схема сопряженных реакций вполне эффективна, благодаря чему обесцвечивание каротиноидов и пониженная их абсорбция в растворе зачастую используются как проба на активность липоксигеназы [8].

9.2.3.4.2. Антиокислительная активность

Поскольку каротиноиды легко окисляются, неудивительно, что они обладают антиоксидантными свойствами. Помимо клеточной и *in vitro* защите от синглетного кислорода, при низком парциальном давлении кислорода каротиноиды ингибируют перекисное окисление липидов [17]. При высоком парциальном давлении кислорода β-каротин обладает свойствами прооксиданта [18]. В присутствии молекулярного кислорода, фотосенсибилизаторов (например, хлорофилла) и под действием света может образовываться синглетный кислород, представляющий собой форму кислорода с высокой реакционной способностью. Известно, что каротиноиды подавляют действие синглетного кислорода и тем самым защищают клетки от окислительного повреждения. Не все каротиноиды одинаково эффективны как фотохимические про-

текторы — известно, что особенно эффективен для подавления синглетного кислорода ликопин (по сравнению с другими каротиноидными пигментами) [30, 130].

Было высказано предположение, что антиоксидантные функции каротиноидов играют определенную роль в снижении рисков онкологических заболеваний, катаракты, атеросклероза и процессов старения [21]. Подробный обзор антиоксидантной роли каротиноидных соединений выходит за рамки данной главы, и с материалами по этому вопросу можно ознакомиться в работах [18, 47, 78, 104, 153].

9.2.3.4.3. *Цис-* и *транс*-изомеризация

Как правило, конъюгированные двойные связи каротиноидных соединений существуют в полной *транс*-конфигурации. В растительных тканях нативно присутствуют и *цис*-изомеры некоторых каротиноидов, особенно в водорослях, которые в настоящее время специально собирают как источник каротиноидных пигментов. Реакции изомеризации легко индуцируются методами термообработки, органическими растворителями, длительным контактом с определенными активными поверхностями, кислотной обработкой и освещением растворов (особенно йодированных). Катализируемая йодом изомеризация является эффективным методом изучения фотоизомеризации, поскольку в результате образуется равновесная смесь конфигураций изомеров. Теоретически результатом изомеризации могут быть большие количества возможных конфигураций, так как в каротиноидах присутствует много двойных связей (например, у β-каротина может быть 272 различные *цис*-формы). Вместе с тем из-за стерических ограничений каротиноиды могут иметь лишь ограниченное число *цис*-изомеров. Из-за большого количества возможных *цис*- и *транс*-изомеров одного каротиноида точные методы изучения этих соединений в пищевых продуктах были разработаны лишь недавно [102, 144]. *Цис-* и *транс*-изомеризация влияет не на цвет каротиноидов, а на провитаминную активность, которая у *цис*-изомеров β-каротина составляет в зависимости от конкретной изомерной формы от 13 до 53% провитамин А-активности полного *транс*-β-каротина [154].

9.2.3.5. Стабильность в ходе переработки

В ходе обычных хранения и транспортировки каротиноиды большинства фруктов и овощей относительно стабильны. Если замораживание вызывает лишь небольшие изменения в содержании каротиноидов, то бланширование влияет на их содержание по сравнению с необработанными растительными тканями весьма существенно. Зачастую в бланшированных пищевых продуктах растительного происхождения содержание каротиноидов явно больше, чем в необработанном сырье. Это обусловлено инактивацией липоксигеназы, которая опосредованно катализирует окислительный распад каротиноидов, переходом растворимых компонентов в воду для бланширования или мягкими режимами тепловой обработки, традиционно применяемыми при бланшировании, благодаря чему увеличивается эффективность экстракции пигментов. Кроме того, жесткие режимы физической гомогенизации и тепловой обработки увеличивают степень экстракции [149] и биодоступность каротиноидов после употребления [114, 143]. Щелочное отделение кожуры, обычно применяемое для очистки батата, обусловливает небольшую степень разрушения и изомеризации каротиноидов.

Хотя каротин исторически считался довольно стойким к нагреванию, в настоящее время известно, что при тепловой стерилизации индуцируются реакции *цис-* и *транс*-изомеризации (см. рис. 9.18). Чтобы снизить избыточную изомеризацию, необходимо уменьшить жесткость режимов термообработки. В случае экструзионной варки и тепловой обработки при высоких температурах в жирах будет происходить не только изомеризация каротиноидов, но и их термический распад. Применение очень высоких температур может привести к образованию летучих продуктов фрагментации. Продукты, образующиеся в результате сильного нагревания β-каротина в присутствии воздуха, аналогичны образующимся в результате сильного нагревания окисленного β-каротина (рис. 9.18). И наоборот, при сушке на воздухе каротиноиды подвергаются воздействию кислорода, что может привести к их расщеплению. Особенно чувствительны к окислительному разложению при воздушной сушке и хранении на воздухе продукты распада с высоким соотношением площади поверхности к массе (например, хлопья из моркови или батата).

После образования *цис*-изомеров происходят лишь небольшие спектральные сдвиги и цвет продукта обычно не изменяется, однако происходит уменьшение провитамин А-активности. Эти реакции имеют

важное нутритивное значение и должны учитываться при выборе аналитических (измеряемых) показателей для провитамина А. Традиционные методы определения содержания витамина А в пищевых продуктах не учитывают различия в провитамин А-активности отдельных каротиноидов и их изомерных форм, в связи с чем приводимые в старой литературе данные по нутритивной ценности пищевых продуктов можно считать ошибочными (особенно для тех пищевых продуктов, которые содержат высокие доли каротиноидов с активностью провитамина А, отличных от β-каротина, и продуктов с большим количеством *цис*-изомеров).

9.2.4. Антоцианы и прочие фенольные соединения

9.2.4.1. Антоцианы

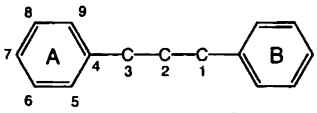
Фенольные соединения составляют большую группу органических веществ, важной подгруппой которых являются флавоноиды. К ним относятся и антоцианы, составляющие одну из наиболее широко распространенных групп пигментов царства растений и отвечающие за широкий диапазон окраски растений — синюю, пурпурную, фиолетовую, темно-лиловую, розовую, красную и оранжевую. Слово «антоциан» образовано из двух греческих — «*anthos*» (цветок) и «*kyanos*» (синий). Антоцианы уже давно привлекают внимание химиков. Наиболее известны из них сэр Роберт Робинсон (*Robert Robinson*, 1886–1975) и проф. Ричард Уиллстаттер (*Richard Willstatter*, 1872–1942), получившие Нобелевскую премию по химии (в том числе и за исследования растительных пигментов).

9.2.4.1.1. Структура

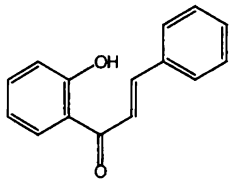
Антоцианы относятся к группе флавоноидов благодаря их характерному углеродному каркасу $C_6C_3C_6$. Базовая химическая структура соединений группы флавоноидов и их взаимосвязь с антоцианами показаны на рис. 9.19. Каждая группа состоит из различных соединений, причем их цвет зависит от наличия и количества замещающих групп в молекуле.

Базовой структурой антоцианов является 2-фенилбензопириллиевая соль флавилия (рис. 9.20). Антоцианы существуют в виде гликозидов полигидрокси- и/или полиметоксипроизводных этой соли и отличаются друг от друга количеством гидроксильных и/или метоксильных групп, типами, количеством и местом присоединения сахаров к молекуле, а также типами и количеством алифатических или ароматических кислот, соединенных с сахарами. Наиболее типичным сахарами являются глюкоза, рамноза, галактоза, арабиноза, ксилоза и гомо- или гетерогенные ди- и трисахариды в виде гликозидов этих сахаров. Чаще всего в ацилировании сахаров участвуют следующие ароматические кислоты: *p*-кумаровая, кофеиновая, феруловая, синаповая, галловая и *p*-гидроксибензойная, а также такие алифатические кислоты, как малоновая, уксусная, яблочная, янтарная или щавелевая. Эти ацильные заместители обычно связаны с С3-сахаром, этерифицированным по 6-ОН или (реже) по 4-ОН-группе. Вместе с тем имеются данные об антоцианах с довольно сложными ацилированными группами (блоками), прикрепленными к различным мономерам сахаров [128, 140].

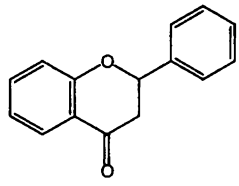
После гидролиза сахарной части антоциана образуется агликон (продукт гидролиза, не являющийся сахаром), называемый антоцианидином. Цвет антоцианов и антоцианидинов является результатом возбуждения молекулы видимым светом. Степень возбуждения молекулы зависит от относительной подвижности электронов в ее структуре. Двойные связи у антоцианов и антоцианидинов возбуждаются очень легко, и для цвета их присутствие необходимо. Известны 19 природных антоцианидинов, но лишь шесть из них встречаются в пищевых продуктах (рис. 9.21). Следует отметить, что в результате возрастающего замещения в антоцианидиновой части молекулы цвет становится более насыщенным (глубоким), что является следствием батохромного сдвига в сторону увеличиения длины волны. Это означает, что полоса светопоглощения в видимом спектре сдвигается из коротковолновой в более длинноволновую область, и цвет меняется с оранжево-красного на пурпурно-синий. Противоположное изменение называют гипсохромным сдвигом. Батохромный эффект обусловлен ауксохромными группами, которые сами по себе не обладают хромофорными свойствами, но когда они прикреплены к молекуле, то вызывают увеличение насыщенности цвета. Ауксохромные группы являются группами-донорами электронов, и у антоцианидинов ими являются гидроксильные и метоксильные группы. Последние вызывают больший батохромный



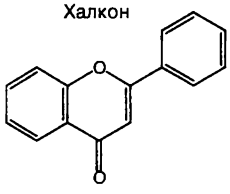
Базовая структура $C_6C_3C_6$



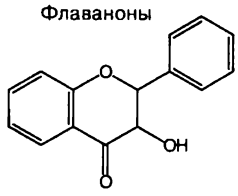
Халкон



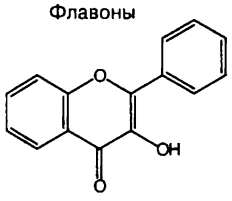
Флаваноны



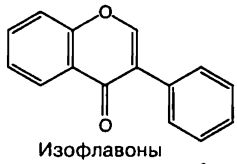
Флавоны



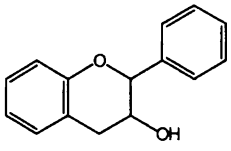
Флаванонолы



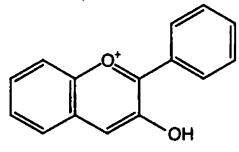
Флаванолы



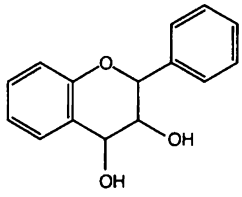
Изофлавоны



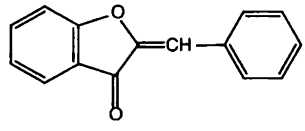
Флаван-3-олы



Антоцианидины



Флаван-3,4-диолы



Ауроны

Рис. 9.19. Углеродные каркасы некоторых флавоноидов в зависимости от структуры их С3-цепи

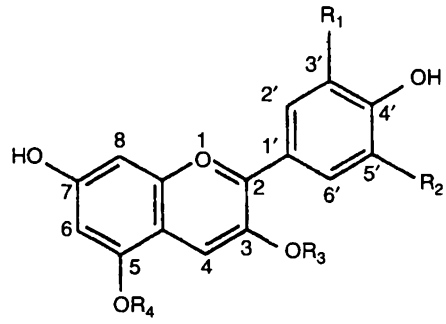


Рис. 9.20. Катион флавилия: R_1 и R_2 — –H, –OH или $–OCH_3$; R_3 — гликозильная группа; R_4 — –H или гликозильная группа.

сдвиг, чем гидроксильные, так как их электронодонорная способность больше. Влияние количества метоксильных групп на интенсивность красного цвета показано на рис. 9.21. Важную роль в цветовых характеристиках антоцианов играют тип замещения сахаров, количество замещенных групп и ацилирование, а также некоторые другие факторы, в частности изменение значения pH, образование металлокомплексов и сопигментация (см. далее).

Антоцианидины менее растворимы в воде, чем соответствующие гликозиды (антоцианы), и в свободном виде в природе не встречаются. Имеющиеся данные (исключая желтую 3-дезоксиформу) об их встречаемости, относятся, скорее всего, к продуктам гидролиза, образующимся в ходе выделения* Свободная 3-гидроксильная группа молекулы антоцианидина дестабилизирует хромофор, и поэтому 3-гидроксильная группа всегда гликозилирована. Дополнительное гликозилирование, скорее всего, будет происходить при С5 (но может также происходить и при С7, –3′, –4′ и/или –5′-гидроксильных группах, см. рис. 9.20). Гликозилирование при С3′ и С4′ исключается стерической преградой [15].

Учитывая структурное разнообразие антоцианов, не удивительно, что в царстве растений их было идентифицировано более 600 [2]. В растениях присутствуют не только смеси антоцианов — у культурных сортов (культиваров) по мере созревания варьируют также относительные их концентрации. Общее содержание антоцианов в растениях колеблется от примерно 20 мг до нескольких граммов на 100 г сырой массы. Подробнее о содержании антоцианов в овощах, фруктах и злаках см. работу [97].

* При выделении антоцианов из растительного сырья с использованием кислотных растворов происходит гидролиз, приводящий к разрушению гликозидных связей. Для выделения антоцианов предпочтительной является экстракция с использованием водно-этанольного экстрагента. Аналогичная картина разрушения гликозидов антоцианов с образованием антоцианидинов наблюдается и при проведении разделения антоцианов методом ВЭЖХ с использованием элюента, содержащего кислоты. — *Примеч. науч. ред.*

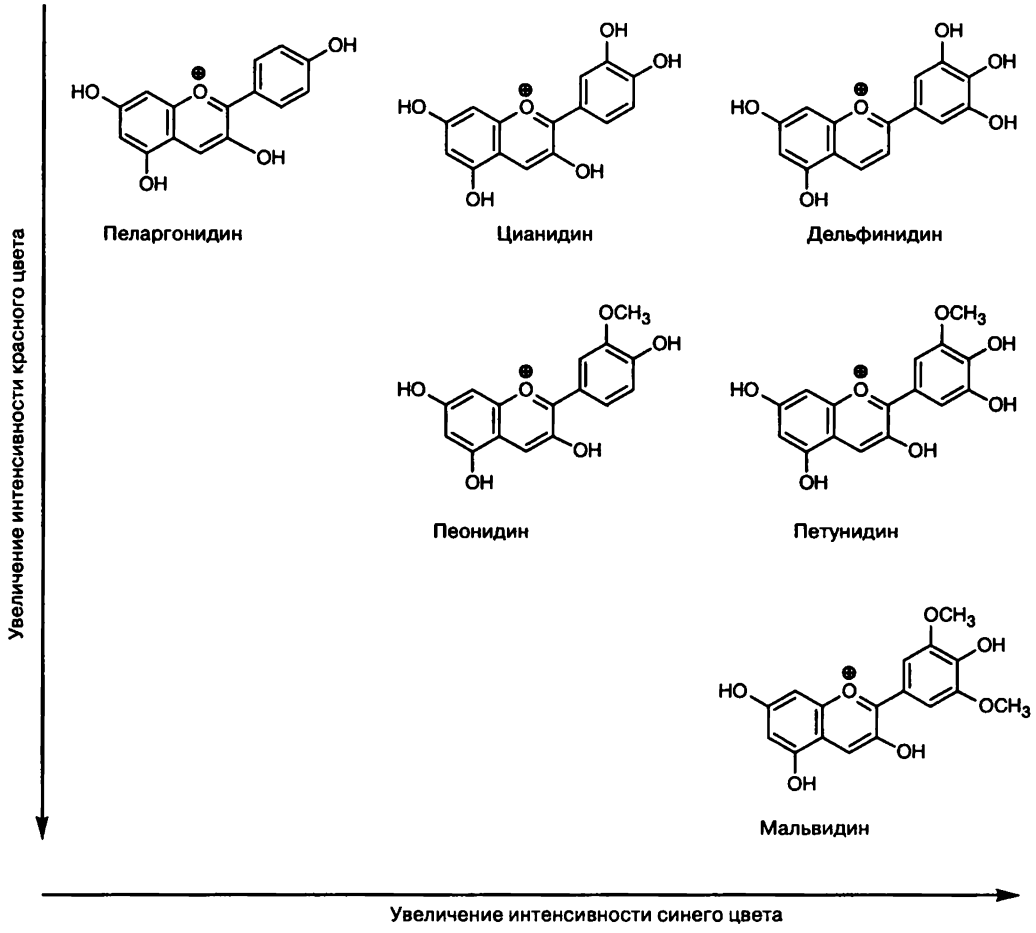


Рис. 9.21. Часто встречающиеся антоцианидины в пищевых продуктах в зависимости от увеличения интесивности красного и синего цвета

9.2.4.1.2. Цвет и стабильность антоцианов

Антоциановые пигменты относительно нестабильны, причем наиболее стабильны они в кислых условиях. На обе цветовые характеристики (оттенок и насыщенность цвета) и на стабильность пигмента сильно влияют замещающие группы на агликоне. Расщепление антоцианов происходит не только в ходе их экстракции из растительной ткани, но и при технологической обработке и хранении пищевых продуктов.

Знание химии антоцианов можно использовать для минимизации их расщепления путем правильного выбора технологических процессов и антоциановых пигментов, наиболее подходящих для планируемого применения. Основными факторами, влияющими на расщепление антоцианов, являются значение pH, температура и концентрация кислорода. Менее значимые факторы — это присутствие расщепляющих ферментов, аскорбиновой кислоты, диоксида серы, ионов металлов и сахаров. Кроме того, на скорость расщепления может влиять явление сопигментации.

9.2.4.1.3. Структурные преобразования и значение pH

Скорости расщепления антоцианов существенно варьируют из-за различий в их структуре. Как правило, увеличение степени гидроксилирования снижает стабильность, а увеличение степени метилирования ее повышает. Цвет пищевых продуктов, содержащих антоцианы, богатые агликонами пеларгонидином, цианидином или дельфинидином, как правило, менее стабилен, чем цвет продуктов, содержащих антоцианы, богатые петунидином или мальвидином. Более высокая стабильность последней группы продуктов

обусловлена блокировкой реакционноспособных гидроксильных групп. Таким образом, увеличение степени гликозилирования (как моноглюкозидов, так и диглюкозидов) повышает стабильность цвета. Было показано, что на стабильность цвета влияет тип сахарного компонента, хотя причины этого до конца не ясны. В работе [131] указывается, что антоцианы клюквы, содержащие галактозу, более стабильны в ходе хранения, чем антоцианы, содержащие арабинозу. Цианидин-3-(2 глюкозилрутинозид) при pH 3,5 и 50 °C имеет период полураспада 26 ч, а цианидин-3-рутинозид — лишь 16 ч [146]. Эти примеры свидетельствуют о том, что на стабильность антоцианов большое влияние оказывают замещающие группы, хотя сами они в реакции не участвуют.

В водной среде, включая водную фазу пищевых продуктов, антоцианы в зависимости от значения могут существовать в четырех возможных структурных формах (рис. 9.22, I): синее хиноидальное основание, красный катион флавилия (AH^+), бесцветное карбинольное псевдооснование (B) и бесцветный халкон (C). Равновесное распределение этих четырех форм в диапазоне pH 0–6 приведено на рис. 9.22 для мальвидин-3-глюкозида (рис. 9.22, II), хлорида дигидроксифлавилия (рис. 9.22, III) и хлорида 4′-метокси-4-метил-7-гидроксифлавилия (рис. 9.22, IV). Для каждого пигмента в этом диапазоне pH важны только две из этих четырех форм. В растворе мальвидин-3-глюкозида при низком значении pH преобладает структура флавилия, тогда как при pH 4–6 доминирует бесцветный карбинол. Аналогичная ситуация характерна и для 4′,7-гидроксифлавилия (кроме тех случаев, когда равновесная смесь состоит в основном из флавилия и халконовой структуры). Таким образом, при приближении значения pH к 6 раствор ста-

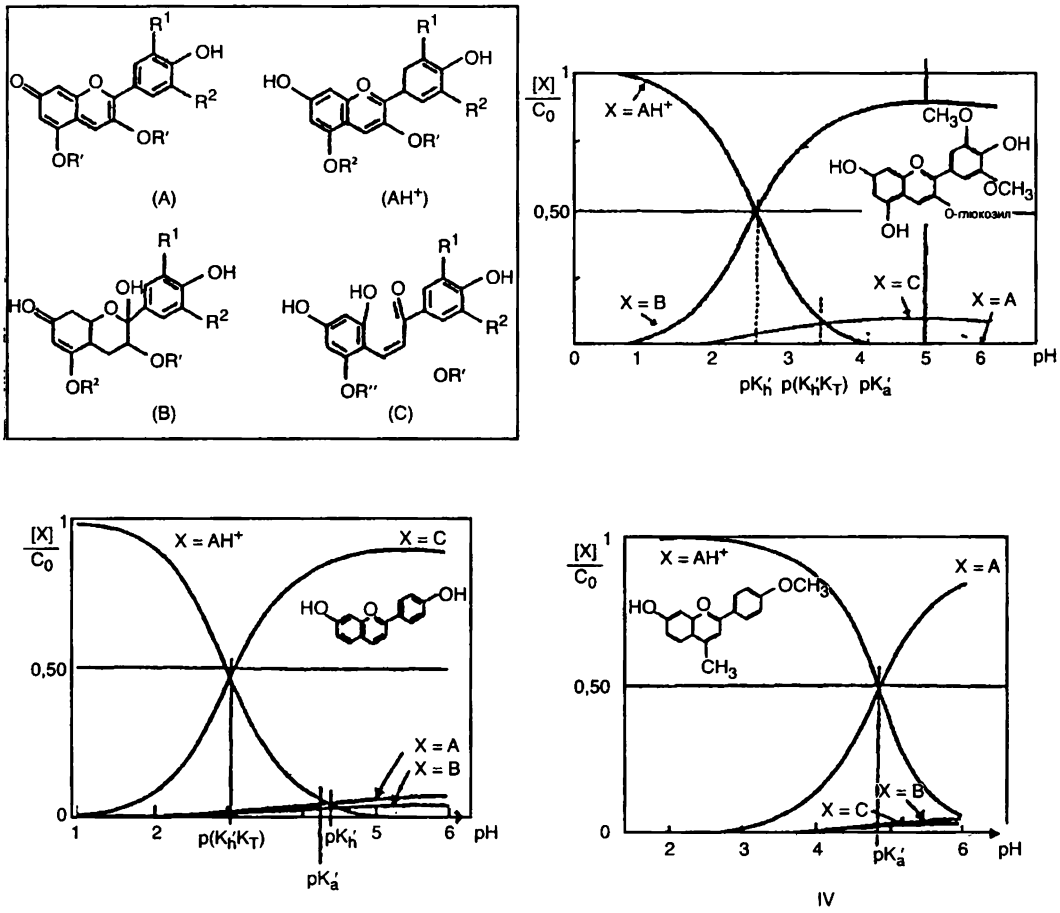


Рис. 9.22. В кислом водном растворе при комнатных температурах присутствуют четыре структуры антоцианов: (I) A — синее хиноидальное основание; (AH^+) — красная соль флавилия; B — бесцветное псевдооснование или метанол; C — бесцветный халкон; (II–IV) равновесное распределение A, AH^+, B и C при 25 °C как функция pH: II — для мальвидин-3-глюкозида; III — для хлорида 4′,7-гидроксифлавилия; IV — для хлорида 4′-метокси-4-метил-7-гидроксифлавилия. По [15]

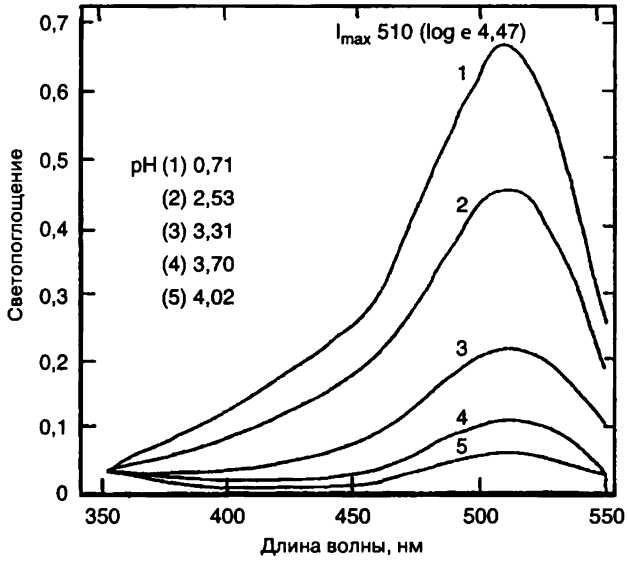


Рис. 9.23. Спектр поглощения цианидин-3-рамнозилглюкозида в буферных растворах при pH 0,71–4,02. Концентрация пигмента — 1,6 10 г/л. По [33]

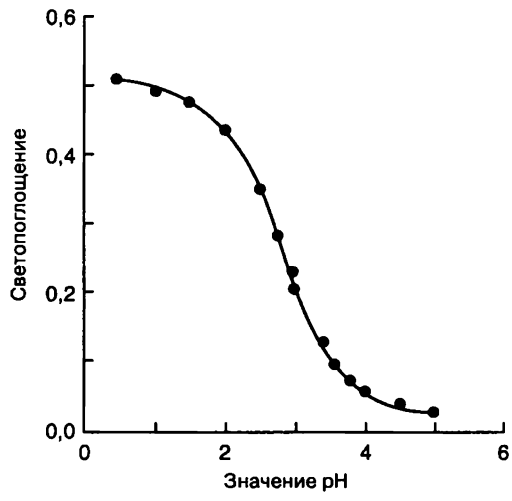


Рис. 9.24. Светопоглощение антоцианов клюквы в засимости от значения pH. По [33]

новится бесцветным. В растворе хлорида 4'-метокси-4-метил-7-гидроксифлавилия существует равновесие между катионом флавилия и хиноидальным основанием. Этот раствор, следовательно, является окрашенным во всем диапазоне pH от 0 до 6, превращаясь из красного в синий по мере возрастания pH.

Влияние значения pH на цвет антоцианов дополнительно показано на рис. 9.23, где приведены спектры цианидин-3-рамнозилглюкозида в буферных растворах при pH от 0,71 до 4,02. Хотя максимум поглощения остается в этом диапазоне pH тем же, интенсивность поглощения с возрастанием pH снижается.

Изменение цвета в смеси антоцианов клюквы как функция pH показано на рис. 9.24. В водной среде (например, в клюквенном напитке) изменение pH может вызвать значительное изменение цвета. Антоцианы обладают наибольшей красящей способностью примерно при pH 1,0, когда молекулы пигмента в основном ионизированы. При pH 4,5 в отсутствие желтых флавоноидов антоцианы во фруктовых соках почти бесцветны (слегка голубоватые), тогда как в присутствии желтых пигментов, как это обычно бывает у фруктов, сок становится зеленым.

9.2.4.1.4. Температура

На стабильность антоцианов в пищевых продуктах существенно влияет температура, присутствие или отсутствие кислорода и, как мы уже отмечали, значение pH и структурная конформация. Как правило, структурные особенности, увеличивающие pH-стабильность, обусловливают также повышение термостойкости. Высокогидроксилированные антоцианидины менее стабильны, чем метилированные, гликозилированные или ацилированные. Например, период полураспада 3,4',5,5',7-пентагидроксифлавилия при pH 2,8 составляет 0,5 сут, а у 3,4',5,5',7-пентаметоксифлавилия — 6 сут [97]. В аналогичных условиях период полураспада цианидин-3-рутинозида составляет 65 сут., а цианидина — 12 ч [95]. Следует отметить, что сравнивать опубликованные данные по стабильности пигментов довольно трудно из-за различных экспериментальных условий. Одна из известных ошибок в опубликованных данных связана с неучетом равновесных реакций между четырьмя известными структурами антоцианов (см. рис. 9.22, I).

Нагревание сдвигает равновесие в сторону халкона, а обратная реакция происходит медленнее, чем прямая. Например, чтобы достичь равновесного состояния халкона 3,5-дигликозида, требуется 12 ч. Так как определение количества остаточного пигмента обычно основано на измерении соли флавилия, то если для достижения равновесия предоставляется недостаточно времени, в расчеты закрадывается ошибка [95].

Таблица 9.8

Влияние значения a_w на стабильность цвета антоцианов[а] при нагревании, определяемую по оптической плотности. По [54]

Время выдержки при 43 °С, мин	Оптическая плотность при значениях активности воды						
	1,00	0,95	0,87	0,74	0,63	0,47	0,37
0	0,84	0,85	0,86	0,91	0,92	0,96	1,03
60	0,78	0,82	0,82	0,88	0,88	0,89	0,90
90	0,76	0,81	0,81	0,85	0,86	0,87	0,89
160	0,74	0,76	0,78	0,84	0,85	0,86	0,87
Изменение оптической плотности за 0–160 мин, %	11,9	10,5	9,3	7,6	7,6	10,4	15,5

[а] Концентрация 700 мг/100 мл. Навеска 1 г промышленно выпускаемого пигмента в порошке/

в некоторых фруктовых соках влияют условия, не благоприятствующие образованию H_2O_2 при окислении аскорбиновой кислоты. Расщепление H_2O_2 пирилиевого кольца путем нуклеофильной атаки на позицию С2 антоциана продуцирует бесцветные эфиры и производные кумарина. Эти продукты могут далее разлагаться или полимеризоваться, образуя в конечном счете бурый осадок, характерный для фруктовых соков.

9.2.4.1.6. Действие света

Обычно считается, что свет ускоряет расщепление антоцианов. Этот неблагоприятный эффект был продемонстрирован на примере некоторых фруктовых соков и красного вина. То, что ацилированные и метилированные дигликозиды более стабильны, чем неацилированные дигликозиды, которые более стабильны, чем моногликозиды, было определено именно в вине [145]. Сопигментация (конденсация антоцианов друг с другом или с другими органическими соединениями) может либо ускорять, либо замедлять их расщепление в зависимости от среды. Сульфонаты полигидроксилированных флавонов, изофлавонов и ауронов препятствуют фоторасщеплению [136]. Этот защитный эффект можно отнести к образованию межмолекулярных взаимодействий колец между отрицательно заряженным сульфонатом и положительно заряженным ионом флавилия (рис. 9.26). Антоцианы, замещенные в положении С5 гидроксильными группами, более чувствительны к фоторасщеплению, чем незамещенные. Незамещенные или монозамещенные антоцианы чувствительны к нуклеофильной атаке в положениях С2 и С4. К деградации антоцианов могут приводить и другие формы лучистой энергии, в том числе ионизирующее излучение [96].

9.2.4.1.7. Сахара и продукты их расщепления

Высокие концентрации сахара, например, во фруктовых пресервах (варенье, конфитюре или джеме) стабилизируют антоцианы. Считается, что это связано со снижением активности воды (см. табл. 9.8). Нуклеофильная атака водой катиона флавилия происходит в позиции С2 с образованием бесцветного карбинольного основания. При концентрации сахара, достаточно низкой для влияния на значение a_w, сахара или продукты их расщепления иногда могут ускорять расщепление антоцианов. В низких концентрациях фруктоза, арабиноза, лактоза и сорбоза оказывают на антоцианы более сильный деструктивный эффект, чем глюкоза, сахароза и мальтоза. Скорость расщепления антоцианов зависит от скорости превращения сахара в фурфурол. Последний, являющийся производным альдопентоз, а также гидроксиметилфурфурол (производное кетогексоз), образуются в результате реакции Майяра или при окислении аскорбиновой кислоты. Эти соединения легко конденсируются с антоцианом, образуя соединения бурого цвета. Механизм этой реакции до сих пор не ясен, но протекание данной реакции очень зависит от температуры, ускоряется в присутствии кислорода и имеет большое значение для фруктовых соков.



Рис. 9.26. Молекулярный комплекс между антоцианом и сульфонатом полигидроксифлавона. По [136]

9.2.4.1.8. Металлы

Металлокомплексы антоцианов широко распространены в растениях и расширяют возможности окраски у цветов. Общепризнано, что для сохранения характерного цвета антоцианов во фруктах и овощах при стерилизации в металлических консервных банках необходимо использовать банки с покрытием. Антоцианы с вицинальными фенольными гидроксильными группами способны секвестрировать некоторые поливалентные металлы. Такое комплексообразование приводит к батохромному сдвигу к синей области спектра. В качестве аналитического инструмента для отличения цианидина, петунидина и дельфинидина от пеларгонидина, пеонидина и мальвидина использовалось добавление к растворам антоциана хлорида алюминия ($AlCl_3$). Последняя группа антоцианидинов не имеет фенольных гидроксильных групп и не реагирует с Al^{3+} (см. рис. 9.21). Было показано, что образование комплексов с металлами стабилизирует цвет пищевых продуктов, содержащих антоцианы. Некоторую защиту антоцианов в клюквенном соке обеспечивают ионы Ca, Fe, Al и Sn, однако посинение и побурение, обусловленные комплексами таннинов с металлами, сводят к нулю все положительные результаты [46].

Изменение цвета фруктов (так называемое «порозовение») относят на счет образования антоциановых металлокомплексов. Известно о таком изменении цвета у груш, персиков и личи. Обычно считается, что это «порозовение» обусловлено превращением бесцветных проантоцианидинов в антоцианы, индуцированным нагреванием в кислых условиях, и сопровождается оно образованием антоциановых комплексов с металлами [89].

9.2.4.1.9. Диоксид серы

Одной из производственных стадий получения «вишни мараскино» (или коктейльной вишни), кондированной (засахаренной) и/или глазированной, является обесцвечивание антоцианов с помощью высоких концентраций SO_2 (0,8–1,5%). Фрукты, содержащие антоцианы, консервируют путем выдерживания их в растворах с 500–2000 мг SO_2/кг, что приводит к образованию бесцветного комплекса. Эта реакция довольно хорошо изучена, и считается, что она включает присоединение SO_2 в позиции C4 (рис. 9.27). Гипотеза об участии 4-й позиции связана с тем, что SO_2 в этой позиции разрушает систему конъюгированных двойных связей и приводит к обесцвечиванию. Расчетная константа скорости реакции обесцвечивания цианидин-3-глюкозида составляет $k = 25\,700$.

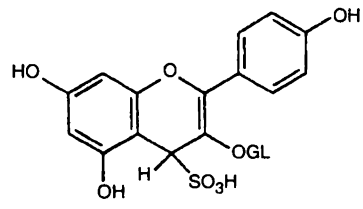


Рис. 9.27. Бесцветный антоциано-сульфатный комплекс

Чем больше константа скорости реакции, тем меньшее количество SO_2 может быстро обесцветить антоциан. У антоцианов, стойких к обесцвечиванию под действием SO_2, либо блокировано положение C4, либо они существуют в виде димеров, связанных по их 4-й позиции [13]. При производстве засахаренной вишни обесцвечивание необратимо.

9.2.4.1.10. Сопигментация

Известно, что антоцианы конденсируются друг с другом (самоассоциация) и с другими органическими соединениями (сопигментация). Слабые комплексы образуются с белками, таннинами, другими флавоноидами и полисахаридами. Хотя большинство из этих соединений сами по себе не окрашены, они усиливают цвет антоцианов, вызывая батохромный сдвиг и увеличение светопоглощения при длине волны его максимума. Эти комплексы обычно более стабильны в ходе переработки и хранения. При виноделии антоцианы подвергаются последовательности реакций, в ходе которых образуются более стабильные сложные винные пигменты. Считается, что стабильный цвет вина является результатом ковалентной самоассоциации антоцианов. Такие полимеры менее чувствительны к значению pH, так как ассоциация происходит по четырем позициям, и стойки к обесцвечиванию под действием SO_2. Кроме того, пигменты-производные антоцианов (витизин A и B) были обнаружены в вине [6, 48] в результате реакции соответственно между мальвидином и пировиноградной кислотой или ацетальдегидом. Эта реакция вызывает гипсохромный сдвиг при видимой длине волны светопоглощения, благодаря чему получается более оранжевый или красный тон по сравнению с типичным пурпурным цветом мальвидина. Вместе с тем вклад

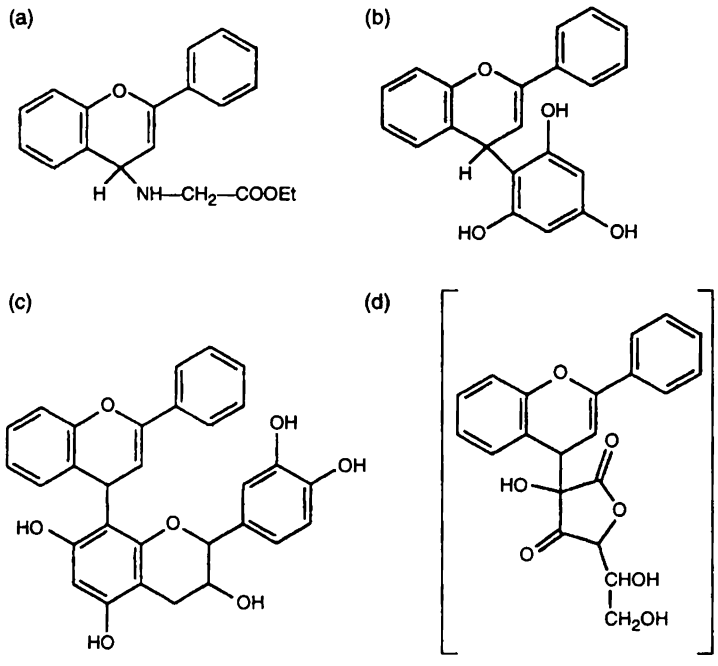


Рис. 9.28. Бесцветные, замещенные в 4-й позиции флав-2-ены, получающиеся в результате конденсации флавилия с этилглицином (*a*), флороглюцином (*b*), катехином (*c*) и аскорбиновой кислотой (*d*). По [95]

витизина в общий цвет вина может быть весьма незначительным [123].

Стабилизировать антоцианы может адсорбция катиона флавилия и/или хиноидального основания на полисахаридах (например, на пектине или крахмале). Такая стабилизация может повысить их полезность в качестве возможных пищевых красителей. Другие реакции конденсации могут вести к обесцвечиванию. Некоторые нуклеофилы (аминокислоты, флороглюцин и катехин) способны конденсироваться с катионами флавилия и образовывать бесцветные, замещенные в 4-й позиции флав-2-ены [95]. Возможные их структуры приведены на рис. 9.28.

9.2.4.1.11. Ацилированные антоцианы как натуральные пищевые красители

Открытие высокостабильных ацилированных антоцианов повысило вероятность использования этих пигментов для придания промышленно выпускаемым пищевым продуктам стабильного желаемого цвета [50]. Примерами пищевых источников стабильных антоцианов желаемого цвета могут служить редиска, красный картофель и батат, краснокочанная капуста, скорцонера (черная морковь или козелец) и краснозерная кукуруза. Среди них как вероятные альтернативы для синтетического пищевого красителя «Красный очаровательный» (E129) выделяются пигменты редиски и красного картофеля. Типичными областями применения красителя E129 обычно являются соки или системы на водной основе с pH ниже 3. С помощью красящих веществ на основе антоцианов успешно окрашиваются и другие пищевые продукты — вишня Мараскино (pH 3,5) с ярким привлекательным и стабильным красным цветом, полученным с помощью экстракта редиски, оказалась очень близкой по цвету к образцам, полученным с использованием E129. К другим возможным областям применения ацилированных антоцианов относится производство молочных продуктов, включая йогурт и молоко [42, 50]. В качестве потенциальной альтернативы искусственным пищевым красителям исследуются также 3-дезоксиантоцианы из сорго [4], которые значительно более стойки к изменениям pH, условиям хранения и переработки и позволяют получать цвета от желто-оранжевого до красного. Повышенная стабильность этих пигментов наряду с их потенциальными полезными для здоровья свойствами предоставляет новые возможности их использования в пищевой промышленности.

9.2.4.1.12. Ферментативные реакции

В обесцвечивании антоцианов участвуют и ферменты, среди которых были выделены две группы — гликозидазы и полифенолоксидазы, которые в совокупности обычно называются антоцианазами. Гликозидазы, как следует из их названия, гидролизуют гликозидные связи с образованием сахаров и агликона. Снижение интенсивности цвета обусловлено пониженной растворимостью антоцианидинов и их преобразованием в бесцветные продукты. Полифенолоксидазы действуют в присутствии *о*-дифенолов и кислорода, окисляющего антоцианы. Фермент сначала окисляет *о*-дифенол до *о*-бензохинона, который, в свою очередь, вступает в реакцию с антоцианами неферментивным путем с образованием окисленных антоцианов и продуктов их расщепления (рис. 9.29) [95].

Несмотря на то что бланширование фруктов широко не применяется, разрушающие антоцианы ферменты можно инактивировать в ходе непродолжительного бланширования (45–60 с при температуре 90–100 °С), что было предложено для обработки садовой вишни перед ее замораживанием. По имеющимся данным, для подавления ферментативного расщепления антоциана в ягодах вишни требуются очень низкие концентрации SO_2 (30 мг/кг) [52]. Аналогичным образом влияние на антоцианы тепловой стабилизации наблюдается в присутствии Na_2SO_3 [1].

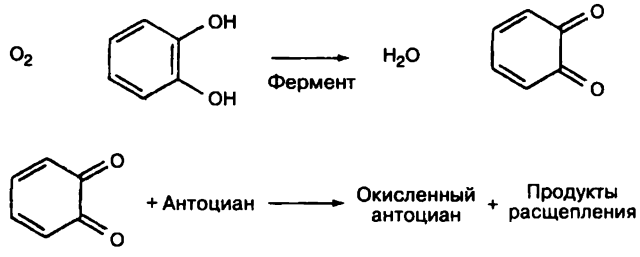


Рис. 9.29. Предполагаемые механизмы расщепления антоцианов полифенолоксидазой. По [108]

9.2.4.2. Прочие флавоноиды

Как мы уже отмечали, антоцианы — это наиболее распространенные флавоноиды. Несмотря на то что желтая окраска пищевых продуктах преимущественно определяется каротиноидами, иногда она вызывается присутствием других флавоноидов, не антоцианов. Кроме того, флавоноиды обусловливают некоторую степень белизны растительных материалов, а продукты окисления флавоноидов с фенольными группами участвуют в образовании встречающихся в природе коричневого и черного цветов. Для определенных групп желтых флавоноидов иногда используют термин «антоксантины» (от греч. *Anthos,* цветок, и *xanthos,* желтый). Различия между классами флавоноидов относятся к состоянию окисления 3-й углеродной связи (см. рис. 9.19). В природе обычно встречаются структуры, которые варьируют от флаван-3-олов (катехин) до флавонолов (3-гидроксифлавоны) и антоцианов. К флавоноидам также относятся флаваноны, флаванонолы, дигидрофлавонолы и флаван-3,4-диолы (проантоцианидин). Кроме того, существует пять классов соединений без базового флавоноидного каркаса, но которые родственны химически и, как правило, включаются в группу флавоноидов, — это дигидрохалконы, халконы, изофлавоны, неофлавоны и ауроны. Соединения внутри этой группы различаются, как и в случае антоцианов, по числу гидроксильных, метоксильных и других заместителей на двух бензольных кольцах. Многие флавоноидные соединения называют по первому источнику, из которого они были выделены, а не по заместителям соответствующего агликона. Такая непоследовательная номенклатура и обусловливает путаницу в классификации соединений.

9.2.4.2.7. Физические свойства

Характеристики светопоглощения классами флавоноидов ясно демонстрируют взаимосвязь цвета и степени ненасыщенности молекулы, а также влияние ауксохромов (молекулярных групп, усиливающих цвет). Во флаванах с замещенными гидроксильными группами, катехине и проантоцианах ненасыщенность прерывается между двумя бензольными кольцами, и поэтому светопоглощение у них такое же, как у фенолов с максимумом светопоглощения в диапазоне между 275 и 280 нм (рис. 9.30, *а*).

У флаванона нарингенина гидроксильные группы присутствуют только в сочетании с карбонильной группой в положении С4, и поэтому не проявляют своих ауксохромных характеристик (рис. 9.30, *b*). Следовательно, светопоглощение нарингенина аналогично светопоглощению флаванов. У флавона лютеолина (рис. 9.30, *с*) гидроксильные группы, связанные с обоими бензольными кольцами, проявляют свои ауксохромные характеристики через конъюгацию С4. Поглощение света более длинных волн (350 нм) обусловлено В-кольцом, а светопоглощение более коротковолнового — А-кольцом. Гидроксильная группа в положении С3 флавонола кверцетина вызывает дальнейший сдвиг максимума светопоглощения к более длинным волнам (380 нм) по сравнению с флавонами (рис. 9.30, *с*). Из-за этого флавонолы при их наличии в достаточно высокой концентрации обусловливают желтизну. К другим сдвигам в характеристиках светопоглощения приводят ацилирование и/или гликозилирование.

Как мы уже отмечали, флавоноиды этих типов могут участвовать в сопигментации, влияющей на многие оттенки цвета в природе. Кроме того, флавоноиды, в частности антоцианы, являются хелатами ме-

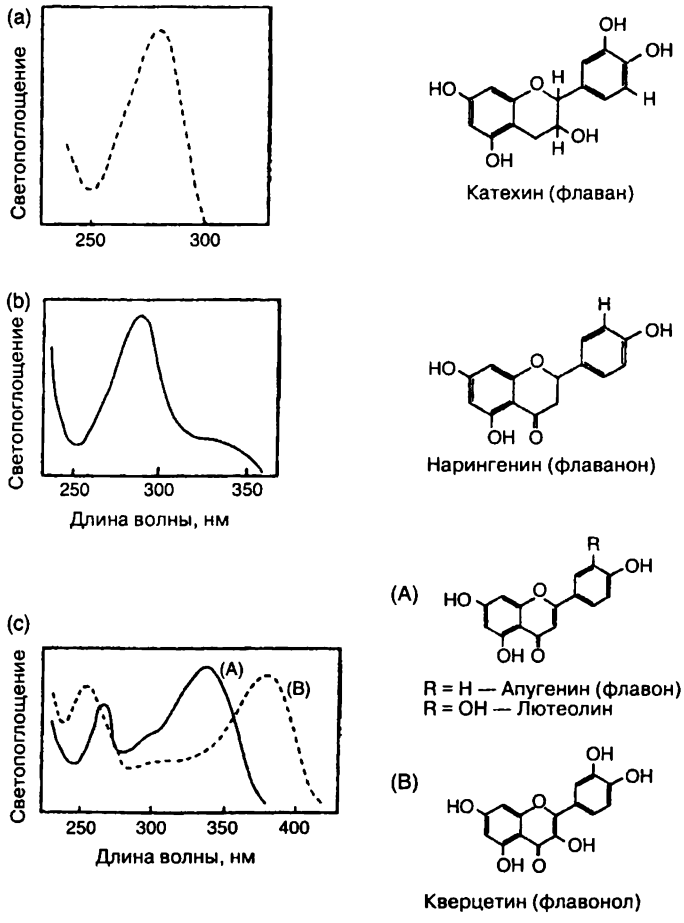


Рис. 9.30. Спектры светопоглощения некоторых флаваноидов

таллов, а образование хелатных комплексов с железом или алюминием повышает насыщенность желтого цвета. При образовании комплексов с алюминием лютеолин, например, дает привлекательный желтый цвет (максимум светополощения при 390 нм).

9.2.4.2.2. Влияние флаваноидов на цвет пищевых продуктов

Неантоциановые (НА) флавоноиды участвуют в образовании цвета пищевых продуктов, однако бледность большинства НА-флавоноидов обычно делает их вклад относительно небольшим. Светлая окраска таких овощей, как цветная капуста, репчатый лук и картофель в значительной степени обусловлена именно НА-флавоноидами, но еще более важен их вклад в окраску через сопигментацию. Параметры комплексообразования этих соединений могут вносить как положительный, так и отрицательный вклад в цвет пищевых продуктов. Например, рутин (3-рутинозид кверцетина) при образовании комплексов с трехвалентным железом вызывает зеленовато-черное изменение окраски консервированной спаржи. Этот нежелательный цвет подавляется добавлением такого хелатора, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Комплекс рутина с оловом дает очень привлекательный желтый цвет, что весьма способствовало приемлемости желтой восковой фасоли до тех пор, пока ее консервирование в оловянных консервных банках без внутреннего покрытия их лаком не было запрещено. Комплекс рутина с оловом более стабилен, чем его комплекс с железом, так что добавление или наличие очень небольших количеств олова способствовало бы образованию комплекса рутина с оловом.

Цвет черных спелых маслин также частично обусловлен продуктами окисления флавоноидов. Один из участвующих в этом процессе флавоноидов — это лютеолин-7-глюкозид. Окисление этого соединения с образованием черного цвета происходит в ходе ферментации и последующего хранения оливок [11]. К прочим очень важным функциям флавоноидов в пищевых продуктах относятся их антиоксидантные свойства и вклад во вкус, в частности, в горечь.

9.2.4.2.3. Проантоцианидины

Проантоцианидины — это бесцветные соединения, структурно сходные с антоцианидинами, которые в ходе переработки пищевых продуктов могут придавать им окраску. Проантоцианидины называют также лейкоантоцианидинами и лейкоантоцианами, а иногда —антоксантином, антоцианогенами, флаволанами, фравиланами и флаилогенами (*flaylogens*). Для обозначения мономерного флавен-3,4-диола (базового структурного элемента проантоцианидинов, рис. 9.31) более подходит термин «лейкоантоцианидин». Проантоцианидины могут существовать как ди- и, тримеры, а также как более высокомолекулярные полимеры. Связь между мономерами, как правило, осуществляется через позиции С4 и С8 или С4 и С6.

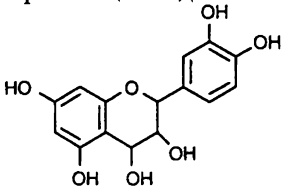


Рис. 9.31. Базовая структура проантоцианидина

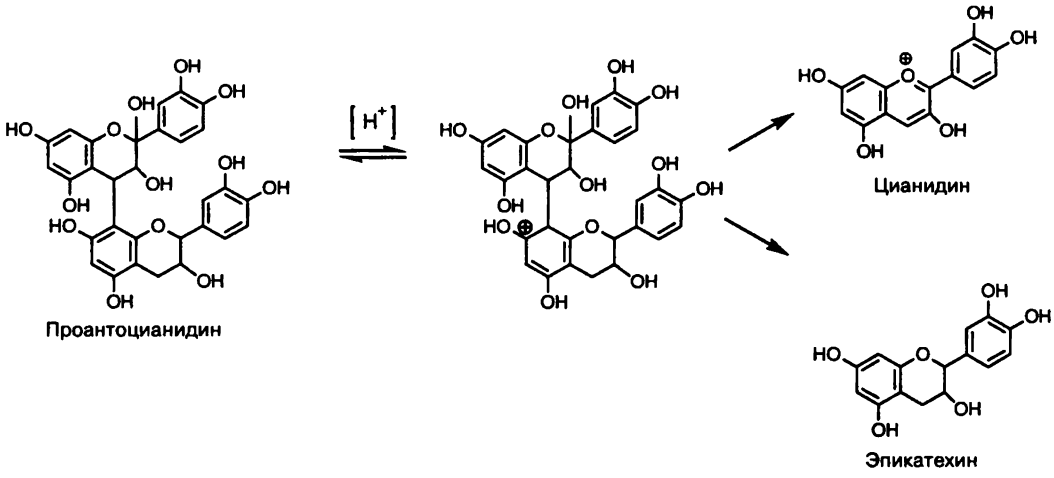


Рис. 9.32. Механизм кислотного гидролиза проантоцианидина. По [41]

Проантоцианидины впервые были обнаружены в бобах какао, при нагревании которых в кислых условиях они гидролизуются до цианидина и (−)-эпикатехина (рис. 9.32) [41]. Димерные проантоцианидины выявлены в яблоках, грушах, орехе кола и других плодах. Известно, что эти соединения расщепляются на воздухе и на свету до стабильных производных красно-коричневого цвета. Они вносят значительный вклад в цвет яблочного и других фруктовых соков, а также в терпкость некоторых пищевых продуктов. При образовании терпкости состоящие из 2–8 мономеров проантоцианидины взаимодействуют с белками. Другие встречающиеся в природе проантоцианидины при гидролизе дают обычные антоцианидины — пеларгонидин, петунидин или дельфинидин.

9.2.4.2.4. Таннины

Строго научного определения таннинов не существует, и этим названием обозначают разные отличающиеся по структуре вещества. Таннины представляют собой особые фенольные соединения, способные объединяться с белками и другими полимерами (например, с полисахаридами). Функционально их определяют как водорастворимые полифенольные соединения с молекулярной массой от 500 до 3000, обладающие способностью осаждать алкалоиды, желатин и другие белки. В природе таннины встречаются в коре дуба и во фруктах.

Химия таннинов довольна сложна. Как правило, их делят на две группы: проантоцианидины, называемые также «конденсированные таннины» (см. выше), и глюкозные полиэфиры галловой кислоты с гексагидроксидифеновыми кислотами (рис. 9.33). Последнюю группу называют также «гидролизуемые таннины», поскольку они состоят из молекулы глюкозы, связанной с несколькими фенольными группа-

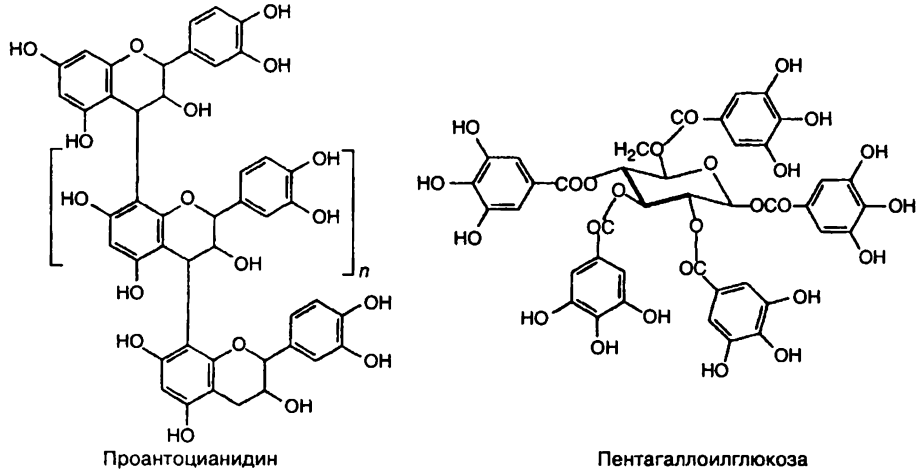


Рис. 9.33. Структура таннинов

ми. Примером может служить глюкоза, связанная с галловой кислотой и лактоном ее димера, эллаговой кислотой. Окраска таннинов — от желтовато-белой до светло-коричневой; кроме того, они придают пищевым продуктам вяжущий вкус. Кроме того, они вносят вклад в цвет черного чая в ходе превращения катехинов во время ферментации в теафлавины и теарубигины. Способность таннинов осаждать белки делает их ценными осветляющими соединениями.

9.2.4.3. Хиноиды и ксантоны

Хиноны — это фенольные соединения с разной молекулярной массой. Они могут быть мономерами (например, 1,4-бензохинон), димерами (1,4-нафтахинон), тримерами (9,10-антрахинон) и полимерами (гиперицин) (рис. 9.34). Хиноны широко распространены в растениях, особенно в древесине, где участвуют в формировании ее цвета. Большинство хинонов имеют горький вкус, а их вклад в цвет растений минимален. Они участвуют в образовании более темных цветов, желтого, оранжевого и коричневого цвета отдельных грибов и лишайников, а также красного, синего и пурпурного цвета морских лилий и насекомых семейства кокцидов. В растениях встречаются соединения со сложными заместителями (нафтохинон и антрахиноны), дающие глубокие цвета от пурпурного до черного. Дополнительные изменения цвета происходят *in vitro* в щелочных условиях при присоединении гидроксильных групп.

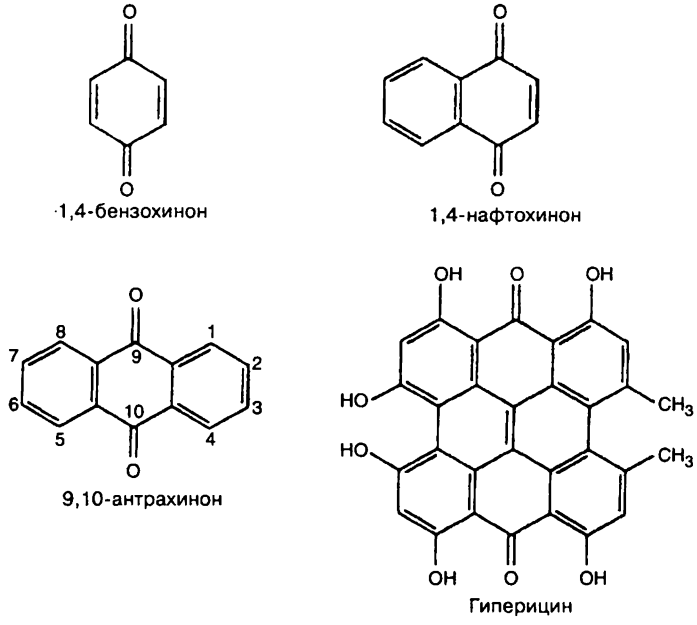


Рис. 9.34. Структура хинонов

Ксантоновые пигменты — это желтые фенольные пигменты, которые зачастую путают с хинонами и флавонами из-за их структурных характеристик, но их легко отличить от хинонов по спектральным характеристикам. Ксантон мангиферин (рис. 9.35) встречается в манго в виде глюкозида.

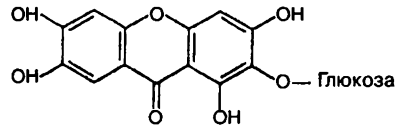


Рис. 9.35. Структура мангиферина

9.2.5. Беталаины

9.2.5.1. Структура

Растения, содержащие беталаины, имеют окраску, подобную растениям с антоцианами. Беталаины представляют собой группу пигментов, содержащих красные бетацианины и желтые бетаксантины, и на их цвет не влияет значение pH (в отличие от антоцианов). Белалаины водорастворимы и присутствуют в вакуолях растительных клеток в виде внутренних солей (цвиттер-ионов). Растения с этими пигментами ограничены десятью семействами порядка центросеменных (*Centrospermae*). Присутствие беталаинов в растениях исключает наличие антоцианов. Общая формула беталаинов (рис. 9.36, *a*) представляет собой конденсацию первичного или вторичного амина с беталамовой кислотой (рис. 9.36, *b*). Все беталаиновые пигменты можно описать как 1,2,4,7,7-пентазамещенные 1,7-диазагептаметиновые системы (рис. 9.36, *c*). При отсутствии расширения конъюгации 1,7-диазагептаметиновой системы с помощью R′ соединение характеризуется максимум светопоглощения при длине волны около 480 нм, что характерно для желтых бетаксантинов. Если конъюгация удлиняется с помощью R′, то максимум светопоглощения сдвигается примерно к 540 нм, что характерно для красных бетацианинов.

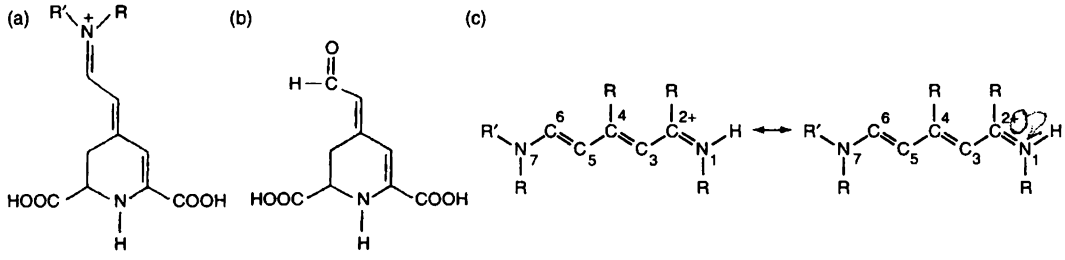
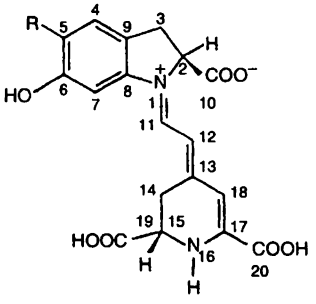
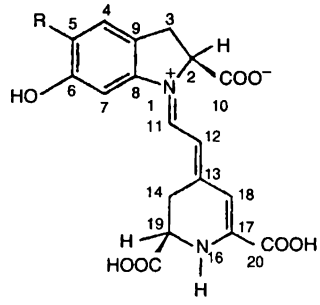


Рис. 9.36. Общие формулы беталаинов

Бетацианины оптически активны благодаря двум хиральным атомам углеродам С2 и С15 (рис. 9.37). Гидролиз бетацианина дает либо бетанидин (рис. 9.37), либо С15-эпимер изобетанидина (рис. 9.37, *d*), либо смесь этих двух изомерных агликонов. Такими агликонами обладают все бетацианины. Различия между бетацианинами обусловлены их глюкозидным остатком. К овощам, содержащими беталаины, относятся красная свекла и амарант. Последний употребляют либо свежим (как «зелень»), либо в зрелом состоянии в виде зерен. Наиболее изучены беталаины красной свеклы, основными из которых являются бетанин и изобетанин (рис. 9.37, *b* и *e*), тогда как в амаранте — это амарантин и изоамарантин (рис. 9.37, *c* и *f*).



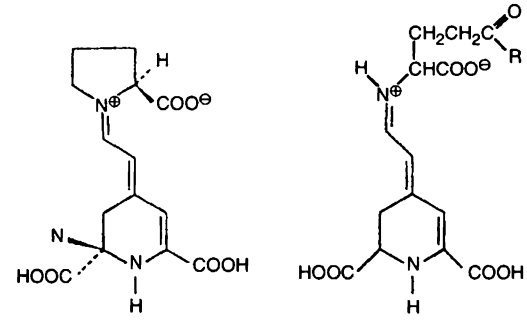
a) Бетанидин, R = –OH
b) Бетанин, R - –Глюкоза
c) Амарантин, R = 2'-глюкуронат глюкозы



d) Изобетанидин, R = – R = –OH
e) Изобетанин, R –Глюкоза,
f) Изоамарантин, R = 2'-глюкуронат глюкозы

Рис. 9.37. Структура бетацианинов

Первым выделенным и описанным бетаксантином был индикаксантин (рис. 9.38, *a*). Структурно бетаксантины очень похожи на бетацианины, но отличаются от них тем, что индольное ядро (центр) замещено на аминокислоту. В случае индикаксантина такой аминокислотой является пролин. Из свеклы были выделены два бетаксантина — вульгаксантин I и II (рис. 9.38, *b*), отличающиеся от индикаксантина тем, что пролин замещен соответственно глютамином или глютаминовой кислотой. Хотя в настоящее время описано лишь несколько бетаксантинов, учитывая количество существующих аминокислот, их может существовать очень много.



а) Индикаксантин

b) Вульгаксантин-I, R = $-NH_2$;
Вульгаксантин-II, R = –OH

Рис. 9.38. Структура бетаксантинов

9.2.5.2. Физические свойства

Беталаины сильно поглощают свет. Для бетанина значение молярного коэффициента поглощения составляет 1120, а для вульгаксантина 750, что свидетельствует об их высокой красящей способности в чистом

состоянии. Спектр растворов бетанина при значениях pH 4,0–7,0 не изменяется с максимумом светопоглощения при длине волны 537–538 нм. В данном диапазоне pH никакого изменения в цвете не происходит. При pH ниже 4,0 максимум светопоглощения сдвигается в более коротковолновый диапазон (при pH 2,0 — 535 нм), а при pH выше 7,0 — в более длинноволновый (при pH 9,0 — 544 нм). Химические свойства, биосинтез и стабильность этих пигментов как пищевых красителей рассмотрены в работе [29].

9.2.5.3. Химические свойства

Как и на другие натуральные пигменты, на беталаины влияют некоторые факторы окружающей среды.

9.2.5.3.1. Нагревание и кислотность

В мягких щелочных условиях бетанин расщепляется до беталамовой кислоты и циклодопа-5-*O*-глюкозида (*CDG*, рис. 9.39). Эти два соединения образуются также в процессе нагревания кислых растворов бетанина или при термообработке пищевых продуктов, в состав которых входит свекла (корнеплод). Эта реакция зависит от pH (табл. 9.9), причем наибольшая стабильность характерна для pH 4,0–5,0. Следует отметить, что реакция требует присутствия влаги, и когда она недоступна или ее ее содержание ограничено, бетанин очень стабилен. Отсюда следует, что снижение значения a_w вызывает уменьшение скорости расщепления бетанина [106]. Для оптимальной стабильности пигментов при хранении свекольного порошка рекомендуется значение a_w 0,12 (содержание влаги по сухой массе около 2%) [24]. Относительно механизмов расщепления бетаксантинов особых исследований не проводилось. Поскольку базовая структура бетацианинов и бетаксантинов одинакова, то на них, по всей вероятности, распространяются механизмы расщепления бетанина.

Расщепление бетанина до беталамовой кислоты и *CDG* обратимо, и поэтому после нагревания происходит частичная регенерация этого пигмента. Предполагаемый механизм регенерации включает образование основания Шиффа путем конденсации альдегидной группы беталамой кислоты и нуклефильного амина *CDG* (см. рис. 9.39). Регенерация бетанина достигает максимума в среднем диапазоне pH (4,0–5,0) [43, 61]. Интересно, что производители консервов традиционно оценивают цвет консервированной свеклы через несколько часов после переработки (по причинам, которые не обязательно им известны).

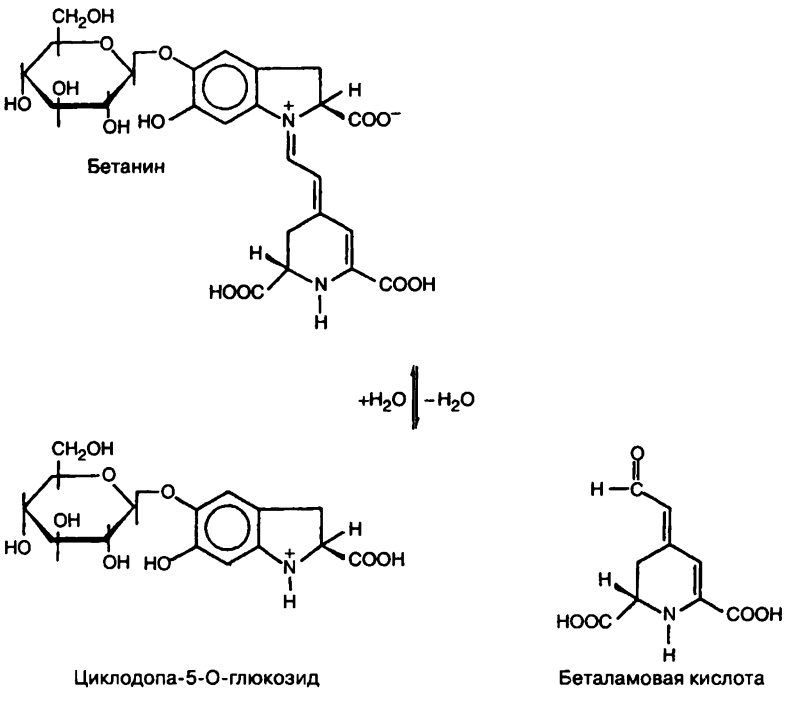


Рис. 9.39. Реакция расщепления бетанина

Бетацианины благодаря хиральному центру в C15 (см. рис. 9.37) существуют в двух эпимерных формах. Эпимеризация обусловливается либо кислотой, либо нагреванием, то есть можно было бы ожидать, что при нагревании содержащих бетанин пищевых продуктов отношение изобетанина к бетанину будет возрастать. Вместе с тем эпимеризация на цвет не влияет. Показано, что при нагревании бетанина в водном растворе может происходить декарбоксилирование. Подтверждением этому является выделение диоксида углерода с одновременной утратой хирального центра. Скорость декарбоксилирования возрастает с увеличением кислотности [62]. Реакции расщепления бетанина под действием кислот и нагревания приведены на рис. 9.40.

Таблица 9.9

Влияние кислорода и значения pH на период полураспада бетанина в водном растворе при 90 °С. По [43]

Значение pH	Значения периода полураспада бетанина, мин	
	Азот	Кислород
3,0	56±6	11,3±0,7
4,0	115±10	23,3±1,5
5,0	106±8	22,6±1,0
6,0	41±4	12,6± 0,8
7,0	4,8±0,8	3,6±0,3

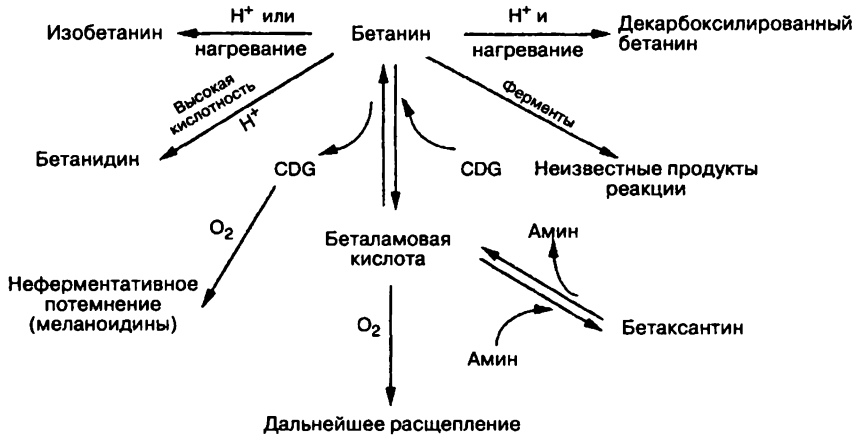


Рис. 9.40. Реакции расщепления бетанина под действием кислоты и нагревания. CDG — Циклодопа-5-глюкозид

9.2.5.3.2. Влияние кислорода на цвет

Еще одним фактором, способствующим расщеплению беталаинов, является присутствие кислорода. Давно известно, что кислород в свободном пространстве упаковки над консервированной свеклой ускоряет обесцвечивание. В растворах с молярным избытком кислорода относительно бетанина потеря последнего подчиняется видимой кинетике первого порядка. Когда концентрация молярного кислорода уменьшается до близкой к концентрации бетанина, его расщепление отклоняется от кинетики первого порядка, а в отсутствие кислорода стабильность бетанина увеличивается. Молекулярный кислород активно участвует в окислительном расщеплении бетанина, и поскольку беталаины чувствительны к окислению, то они являются эффективными антиоксидантами [152]. На расщепление бетанина в присутствии кислорода влияет также значение pH (см. табл. 9.9).

Окисление беталаинов ускоряется в присутствии света. Присутствие таких антиоксидантов, как аскорбиновая и изоаскорбиновая кислоты, повышает стабильность беталаинов. Так как катионы меди и железа катализируют окисление аскорбиновой кислоты молекулярным кислородом, то они снижают эффективность аскорбиновой кислоты как протектора беталаинов. Присутствие хелаторов металлов (ЭДТА или лимонной кислоты) значительно повышает эффективность аскорбиновой кислоты как стабилизатора беталаинов [3, 9].

Некоторые фенольные антиоксиданты, включая бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуол, катехин, кверцетин, нордигидрогваяретовую и хлорогеновую кислоты, а также α-токоферол, подавляют цепное свободнорадикальное автоокисление. Поскольку такое окисление, по-видимому, не участвует в окислении беталаинов, не удивительно, что эти антиоксиданты не являются эффективными стабилизаторами бетанина. Аналогичным образом серосодержащие антиоксиданты типа сульфита и метабисульфита натрия не только не эффективны как стабилизаторы, но и ускоряют обесцвечивание. Тиосульфит натрия, будучи плохим акцептором кислорода, на стабильность бетанина не влияет. В качестве стабилизаторов

бетанина также не эффективны тиопропионовая кислота и цистеин. Все эти наблюдения подтверждают, что бетанин по свободнорадикальному механизму не разлагается и, таким образом, чувствительность беталаинов к кислороду ограничивает их применение в качестве пищевых красителей.

9.2.5.3.3. Превращение бетацианина в бетаксантин

В 1965 г. было установлено, что бетаксантин индикаксантин может образовываться под вакуумом из бетацианина, бетанина и избытка пролина в присутствии 0,6 Н гидроксида аммония. Это стало первым убедительным свидетельством структурной взаимосвязи бетацианина и бетаксантина. Позже было показано, что при образовании бетаксантина из бетанина участвует конденсация продукта гидролиза бетанина (беталамой кислоты) и аминокислоты (рис. 9.41) [59, 112, 113].

Относительно стабильности бетаксантинов данных довольно мало. Подобно бетацианинам, их стабильность зависит от значения pH. На рис. 9.42 показаны различия в термостойкости бетацианина, бетанина и бетаксантина, а также вульгаксантина в одинаковых экспериментальных условиях. Из механизма, приведенного на этом рисунке, следует что избыток соответствующей аминокислоты сдвигает равновесие в сторону соответствующего бетаксантина и снижает содержание беталамовой кислоты в растворе. Избыток аминокислоты повышает стабильность образованного бетаксантина, снижая содержание имеющейся в распоряжении беталамовой кислоты. Этот эффект показан двумя верхними кривыми. Превращение бетацианина в бетаксантин может происходить в высокобелковых продуктах, что является причиной потери красного цвета продуктов, окрашенных беталаинами.

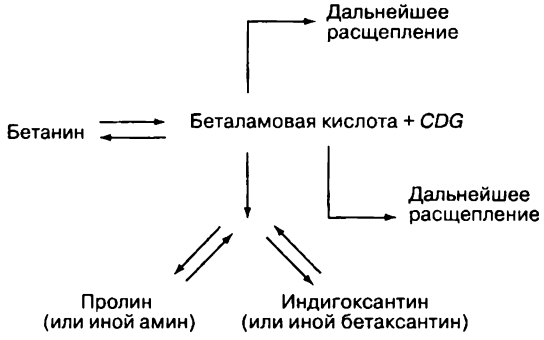


Рис. 9.41. Образование индикаксантина из бетанина при избытке пролина

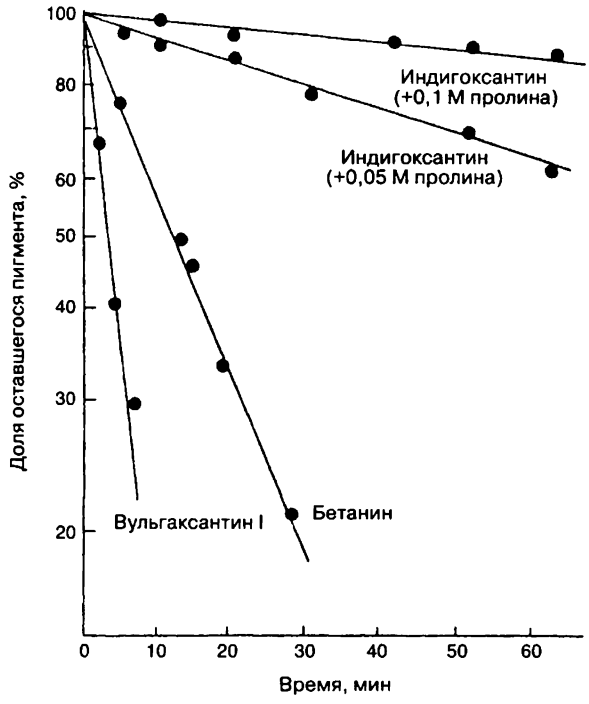


Рис. 9.42. Стабильность бетанина, вульгаксантина I и индикаксантина (в присутствии пролина) в растворе при pH 5,0, температуре 90 °C и атмосферных условиях

9.3. Пищевые красители

9.3.1. Нормативные аспекты

9.3.1.1. США

В США использование красителей регулируется Законом о пищевых продуктах, медикаментах и косметике от 1938 г. с дополнением от 1960 г. по красящим веществам. В этом дополнении все окрашивающие вещества разделены на две категории: сертифицируемые пищевые красители и красители, не требующие сертификации. Первые представляют собой синтетические красители (краски), которые в природе не встречаются. Сертификация означает, что данный краситель соответствует определенным государственным стандартам качества. Для определения соответствия образцы каждой партии продукции должны быть переданы в лабораторию *FDA*. Если партия соответствует стандарту, ей присваивается официальный номер. Сертифицированные красители затем классифицируются или как разрешенные постоянно, или как разрешенные временно. Временно разрешенный сертифицированный краситель можно

законно применять до завершения научных исследований, необходимых для выдачи разрешения на постоянную сертификацию. Все это относится и к красящим лакам.

Красители, не требующие сертификации, представлят собой натуральные пигменты или идентичные натуральным синтетические красители. Примером последних может служить β-каротин, который широко распространен в природе, но может и синтезироваться с получением пищевого красителя, идентичного натуральному*.

Дополнение по пищевым красителям включает упрощенную номенклатуру сертифицированных красителей. Вместо длинных и трудных тривиальных названий сертифицированные красители обозначаются номером и аббревиатурой *FD&C*, *D&C* или *Ext.* (для наружного применения) *D&C*. *FD&C*-красители могут использоваться в пищевых продуктах, лекарственных препаратах и в косметических средствах. Красители *D&C и Ext. D&C* могут использоваться только в лекарственных или косметических средствах. Таким образом, сертифицированный краситель «Желтый закат *FC*» обозначается *FD&C Yellow* № 6**

В действующем списке сертифицированных красителей содержится семь общедоступных красящих веществ (табл. 9.10). Можно использовать и два дополнительных красителя — «Оранжевый B» и «Цитрусовый красный № 2», но их применение ограничено особыми областями (первый может использоваться только в целях окрашивания оболочек и покрытий для колбасных изделий, причем в количестве не более 150 мг/кг готового продукта, а второй — только для окрашивания кожуры апельсинов, не предназначенной для потребления или переработки, причем в количестве не более 2 мг/кг общей массы фрукта)***

С принятием Закона о маркировке и этикетировании пищевых продуктов от 1990 г., вступившего в силу с 1994 г., указание применяемых пищевых красителей на этикетке стало обязательным. Красители, не требующие сертификации, должны быть указаны как синтетические красители или как видовое обозначение красящего вещества. Вместе с тем использование термина «натуральный» в отношении красящих веществ запрещено, так как это может заставить потребителя поверить, что краситель получен из данного пищевого продукта. Красящие добавки, не требующие в настоящее время сертификации, указаны в табл. 9.10.

Таблица 9.10

Сертифицированные пищевые красители, разрешенные в настоящее время для применения в США, и их Е-коды. По *Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter 1, Part 73, revised as of April 2004*

Название	Статус		Общепринятое (тривиальное) название	Е-коды
	как пищевого красителя	как пищевого лака		
FD&C Синий № 1	Постоянный	Временный	Бриллиантовый голубой	E133
FD&C Синий № 2	Постоянный	Временный	Индигокармин	E132
FD&C Зеленый № 3	Постоянный	Не включен в перечень	Прочный зеленый	В странах ЕС не разрешен
FD&C Красный № 3[b]	Постоянный	Временный	Эритрозин	E127
FD&C Красный № 40	Постоянный	Временный	Красный очаровательный	E129
FD&C Желтый № 5	Постоянный	Временный	Тартразин	E102
FD&C Желтый № 6	Постоянный	Временный	Желтый «Солнечный закат»	E110

[b] Использование лака FD&C Красный No. 3 с 29 января 1990 г. запрещено. В РФ использование пищевого красителя FD&C Красный № 3 (Эритрозин, E127) также запрещено.

* Согласно существующему в России законодательству оценке подвергаются все виды пищевых красителей на соответствие их требованиям Спецификации объединенного комитета ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (*Compendium JECFA*). — *Примеч. науч. ред.*

** В Российской Федерации для упрощения номенклатуры пищевых красителей, как и в странах Евросоюза, используется кодировка «Е» — например, краситель «Желтый солнечный закат FC» обозначается как E110. — *Примеч. науч. ред.*

*** В Российской Федерации в настоящее время разрешены для использования в пищевой промышленности 37 наименований пищевых красителей. Следует отметить, что этот список включает в себя синтетические красители (сертифицированные по терминологии, принятой в США) и натуральные красители. — *Примеч. науч. ред.*

9.3.1.2. Международные нормативные акты

Красящие вещества добавляют к пищевым продуктам во многих странах мира, но перечни пищевых красящих веществ, разрешенных к применению, в разных странах существенно различаются. Поскольку роль международной торговли постоянно растет, нормативные акты по красящим веществам в настоящее время вызывают серьезную озабоченность. К сожалению, не существует «общемирового» перечня разрешенных к применению пищевых красителей, и многие из них стали своего рода торговым барьером для пищевых продуктов. В США, например, *FD&C* Красный № 40 разрешен для пищевого использования, а *FD&C* Красный № 2 с 1976 г. запрещен. С другой стороны, в Норвегии в производстве пищевых продуктов запрещено использование любых синтетических красителей. Контрольно-регламентирующие органы ЕС сделали попытку унифицировать нормативные документы для стран ЕС, в результате которой всем разрешенным красящим добавкам был присвоен код Е (см., например, табл. 9.10). Информация по натуральным красителям, разрешенным в странах ЕС, приведена в табл. 9.11. При этом следует помнить, что использование того или иного красителя может быть ограничено одним или более конкретными продуктами, причем тот или иной разрешенный в ЕС краситель в отдельных странах может быть запрещен. В целом, наибольшая свобода применения как синтетических, так и натуральных красителей в настоящее время характерна для стран ЕС (в США и Канаде существуют более строгие ограничения). Исторически очень жесткая политика относительно использования красящих веществ в пищевых продуктах была характерна для Японии, где были запрещены все синтетические красители, но и эта страна недавно расширила свой перечень, включив в него с декабря 2004 г. не только нехимически синтезированные пищевые добавки, но и 12 различных синтетических красителей и некоторые лаки (все ограниченного применения). В японский перечень специализированных добавок в соответствии с законом о пищевой санитарии [70] включены все 7 *FD&C*-красителей и лаков, кроме *FD&C* Желтого № 6.

ФАО и ВОЗ сделали попытку гармонизации пищевых регламентов посредством Кодекса Алиментариус. Для работы в глобальном масштабе по оценке безопасность пищевых добавок был образован Объединенный комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (*JEFCA*), который разработал нормы их «допустимого суточного потребления» (*ADI*), включая пищевые красители (табл. 9.12)*. Общие усилия по установлению степени безопасности красителей должно привести к принятию международных нормативных документов относительно использования красящих веществ в пищевых продуктах.

9.3.2. Свойства сертифицированных красителей

В последние годы большое внимание уделяется безопасности сертифицированных красителей. Причина беспокойства общественности частично объясняется ассоциацией синтетических красителей с каменноугольной смолой — жирным черным веществом, непригодным для использования в пищевых продуктах. Сырье для синтеза пищевых красителей подвергается высокой степени очистки. Готовый продукт представляет собой специфическое химическое соединение, имеющее мало общего с каменноугольной смолой.

Сертифицированные красители делятся на четыре основных химических класса: азо-красители, трифенилметан-, ксантин- или индиго-красители. В табл. 9.13 приведены *FD&C*-красители, их химический класс и некоторые свойства. Структурные формулы этих красителей приведены на рис. 9.43, а данные по растворимости и стабильности — в табл. 9.14.

Упрощенная последовательность химического синтеза трифенилметанового красителя *FD&C* Зеленый № 3 приведена на рис. 9.44. При производстве любого красителя основная трудность заключается в соответствии с техническим требованиям по чистоте, заданным для сертификации в США (см. *CFR, Title 21, Part 70–83*). В производстве пищевых красителей эти требования не только соблюдаются, но, как правило, и превосходятся.

Содержание чистого красителя в типичном сертифицированном красящем веществе составляет 86–96% с погрешностью 2–3%, так как такая погрешность не имеет принципиального значения для окон-

*Нормативами *JECFA* также установлены и требования к качеству и безопасности пищевых красителей, известные как Спецификация объединенного комитета экспертов *FAO/WHO* по пищевым добавкам или *Compendium*). — *Примеч. науч. ред.*

Таблица 9.11

Пищевые красители США, не требующие в настоящее время сертификации, ограничения на их примиение и их Е-коды. По *Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter 1, Part 73, revised as of April 2004.*

Раздел *CFR*	Краситель	Ограничения по применению в США	Е-код[a]
73.30	Экстракт аннато	*GMP*	E160b
73.35	Астаксантин	< 80 мг/кг рыбьего корма	
73.40	Обезвоженная свекла (свекольный порошок)	*GMP*	E162
73.50	Ультрамариновый синий	Соль для кормов для животных	
73.75	Кантаксантин	< 30 мг на фунт твердых и полутвердых продуктов или на пинту жидкости	E161g
		< 4,41 мг/кг корма для цыплят	
73.85	Сахарный колер	*GMP*	E150
73.90	[β]-Апо-8'-каротиналь	< 15 мг на фунт твердых и полутвердых продуктов или на пинту жидких продуктов	E160e
73.95	[β]-Каротин	*GMP*	E160a(ii)
73.100	Экстракт кошенили; кармин	*GMP*	E120
73.125	Медные комплексы хлорофиллов	< 0,2% для сухих концентратов напитков на цитрусовой основе	E141
73.140	Обжаренная, частично обезжиренная мука (порошок) из семян хлопчатника после тепловой обработки	*GMP*	
73.160	Глюконат железа (II)	*GMP* только для спелых оливок	
73.165	Лактат железа (II)	*GMP* только для спелых оливок	
73.169	Экстракт красящих веществ винограда	*GMP* для пищевых продуктов (не напитков)	E163
73.170	Экстракт кожицы винограда (эноцианин)	*GMP* для напитков	E163
73.185	Порошок из водоросли гематококкус	< 80 мг/кг корма для лососевых рыб	
73.200	Синтетическая окись железа	Корма для животных, до 0,25%	E172
73.250	Фруктовый сок	*GMP*	
73.260	Овощной сок	*GMP*	
73.275	Мука из сушеных водорослей	*GMP*, для корма для цыплят	
73.295	Порошок и экстракт из бархатцев прямостоячих	*GMP*	
73.300	Морковное масло	*GMP*	
73.315	Масло из эндосперма кукурузы	*GMP*, для корма для цыплят	
73.340	Паприка	*GMP*	E160c
73.345	Экстракт паприки	*GMP*	E160c
73.355	Дрожжи *Phaffia*	< 80 мг/кг корма лососевых рыб	
73.450	Рибофлавин	*GMP*	E101
73.500	Шафран	*GMP*	
73.575	Диоксид титана	< 1% от массы продукта	E171
73.600	Куркума	*GMP*	E100
73.615	Экстракт куркумы	*GMP*	E100

[a] В странах ЕС разрешено использование антоцианов и концентратов соков (E163), свекольных пигментов (E162) и хлорофиллов (E140).

Сокращение: *GMP* — Правильные методы производства.

Таблица 9.12

Допустимое суточное потребление некоторых синтетических и натуральных пищевых красителей. По Hendry G. A. F., Haughton J. D. (eds). *Natural Food Colorants*. — NY: Van Nostrand Reinhold, 1992

Краситель	Код E	*ADI*, мг/кг массы тела
Куркумин	E100	0,1
Рибофлавин[a]	E101	0,5
Тартразин	E102	7,5
Кармины	E120	5,0
Эритрозин	E127	0,1
Бриллиантовый голубой *FCF*	E133	12,5
Хлорофиллы[a]	E140	Не установлена
Сахарный колер	E150	200
β-каротин	E160a	5,0
Экстракт аннато	E160b	0,065
Экстракт паприки	E160c	Не установлена
Свекольный экстракт	E162	Не установлена
Антоцианы	E163	Не установлена
Экстракт кожицы винограда[a]	E163	2,5

[a] По Francis F. J. *Colorants*. — St Paul, Minnesota, USA: Eagan Press Handbook Series, 1999.

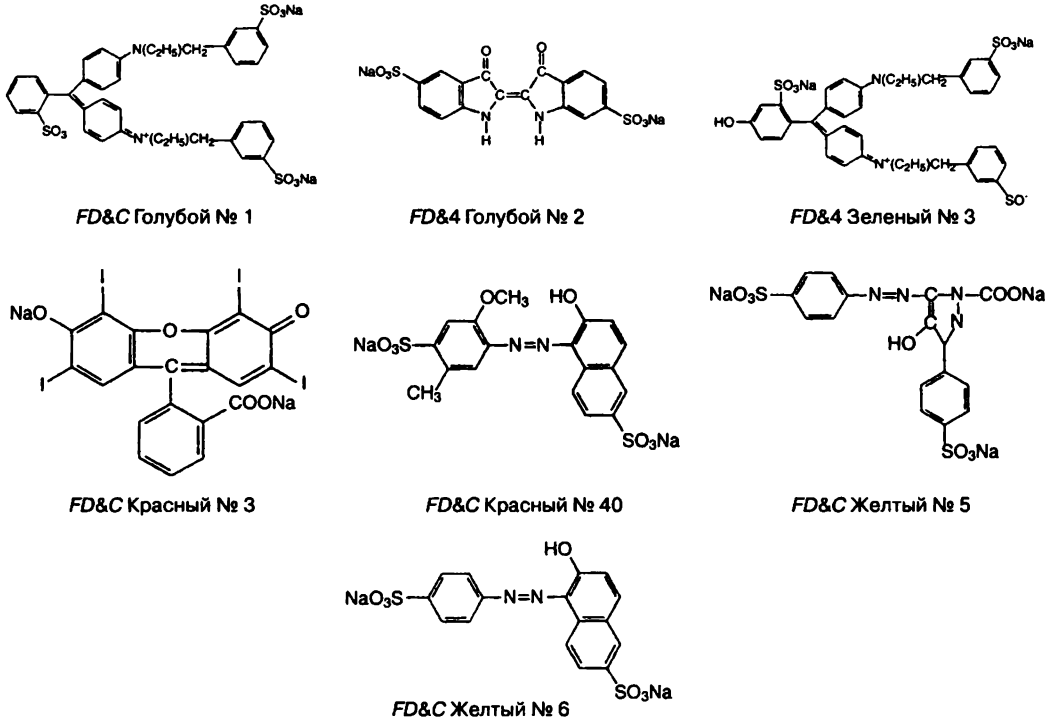


Рис. 9.43. Структурные формулы сертифицированных пищевых красителей, разрешенных к применению в США

Таблица 9.13

Химические и физические свойства сертифицированных пищевых красителей

Тривиальное название и *FD&C*-номер	Тип красителя	Растворимость, г/100 мл[a]												Стабильность[1,b]					
		в воде		в пропилен-гликоле		в спирте		в глицерине		При значениях pH:				На свету	10% AcOH	10% NaOH	250 мг SO_2/кг	1%-ная аскорбиновая кислота	1%-ный натрия бензоат
		25 °C	60 °C	25 °C	60 °C	25 °C	60 °C	25 °C	60 °C	3,0	5,0	7,0	8,0						
FDC Голубой № 1	Трифенил-метан	20,0	20,0	20,0	20,0	0,35	0,20	20,0	20,0	4	5	5	5	3	5	4	5	4	6
FDC Синий № 2	Индиго	1,6	2,2	0,1	0,1	Н	0,007	20,0	20,0	3	3	2	1	1	1	2^{b2}	1	2	4
FDC Зеленый № 3	Трифенил-метан	20,0	20,0	20,0	20,0	0,01	0,03	1,0	1,3	4	4	4	4^{bl}	3	5	2^{bl}	5	4	6
FDC Красный № 3	Ксантин	9,0	17,0	20,0	20,0	Н	0,01	20,0	20,0	Н	Н	6	6	2	Н	2	Н	Н	5
FDC Красный № 40	Азо	22,0	26,0	1,5	1,7	0,001	0,113	3,0	8,0	6	6	6	6	5	5	3^{bl}	6	6	6
FDC Желтый № 5	Азо	20,0	20,0	7,0	7,0	Н	0,201	18,0	18,0	6	6	6	6	5	5	4	3	3	6
FDC Желтый № 6	Азо	19,0	20,0	2,2	2,2	Н	0,001	20,0	20,0	6	6	6	6	3	5	5	3	2	6

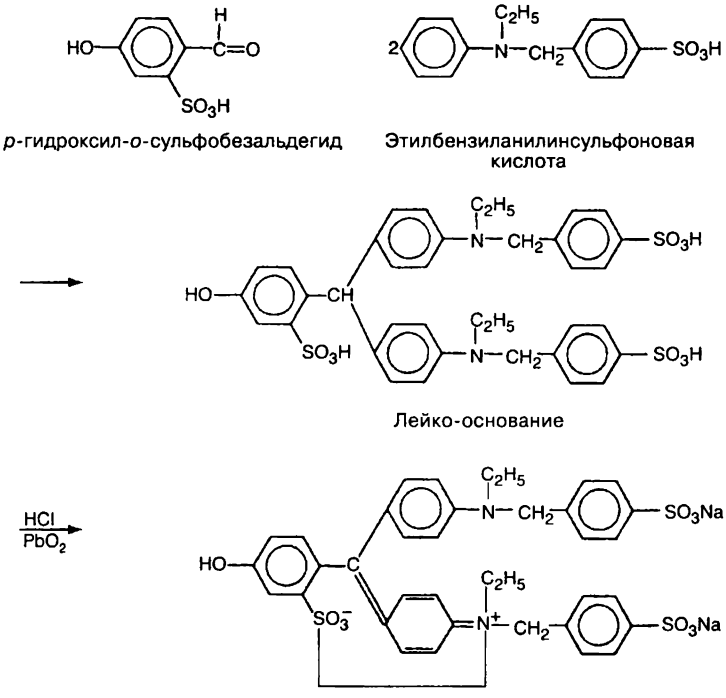
Обозначения. Н — нерастворим; 1 — полное обесцвечивание; 2 — значительное обесцвечивание; 3 — заметное обесцвечивание; 4 — слабое обесцвечивание; 5 — очень слабое обесцвечивание; 6 — без изменений; [bl] — цвет синеет; [b] — цвет желтеет.

Таблица 9.14

Химические и физические свойства красителей ЕС

Название и Е-индекс	Растворимость, г/100 мл при 16 °C				Стабильность				
	в воде	в пропиленгликоле	в спирте	в глицерине	На свету	При нагревании	SO_2	Значение pH	
								3,5–4,0	8,0–9,0
Хинолиновый желтый, Е104	14	<0,1	<0,1	<0,1	6	5	4	5	2
Понсо 4R, Е124	30	4	<0,1	0,5	4	5	3	4	1
Кармуазин, Е122	8	1	<0,1	2,5	5	5	4	4	3
Амарант, Е123	5	0,4	<0,1	1,5	5	5	3	4	3
Патентованный синий, Е131	6	2	<0,1	3,5	7	5	3	1	2
Зеленый S, Е142	5	2	0,2	1,5	3	5	4	4	3
Шоколадный коричневый HT, Е156	20	15	Н	5	5	5	3	4	4
Бриллиантовый черный BN, Е151	5	1	<0,1	<0,5	6	1	1	3	4

Обозначения. 1 — полное обесцвечивание; 2 — значительное обесцвечивание; 3 — заметное обесцвечивание; 4 — слабое обесцвечивание; 5 — очень слабое обесцвечивание; 6 — без изменений.



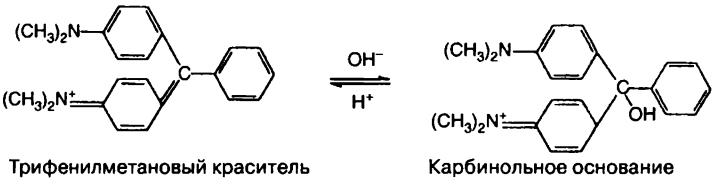
p-гидроксил-*o*-сульфобезальдегид

Этилбензиланилинсульфоновая кислота

Лейко-основание

FD&C Зеленый № 3 («стойкий зеленый»)

Рис. 9.44. Синтез красителя *FD&C* Зеленый № 3 («Стойкий зеленый»)



Трифенилметановый краситель

Карбинольное основание

Рис. 9.45. Образование бесцветного карбинольного основания из трифенилметанового красителя

чательного цвета продукта. Содержание влаги в порошковом красителе составляет 4–5%, содержание соли (золы) — около 5%. Высокое содержание золы обусловлено солью, используемой для кристаллизации красителя. Несмотря на то что технически возможно удалять используемый хлорид натрия, это удорожает технологический процесс без особых преимуществ.

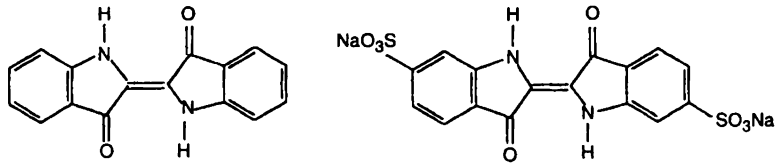
Все водорастворимые *FD&C*-азокрасители имеют кислотную природу, и их физические свойства довольно сходны. Химически они легко восстанавливаются сильными восстановителями и поэтому чувствительны к окислителям. *FD&C*-трифенилметановые красители (*FD&C* Зеленый № 3 и *FD&C* Голубой № 1) сходны по структуре, отличаясь только одной –OH-группой, то есть различия между ними по растворимости и стабильности незначительны. Замещение группы сульфокислоты на гидроксильную группу в любом из этих красителей повышает стойкость к действию света и к щелочи. Щелочное обесцвечивание трифенилметанового красителя происходит с образованием бесцветного карбинольного основания (рис. 9.45). Ортозамещенная группа сульфокислоты стерически препятствует доступу гидроксильного иона к центральному атому углерода, предотвращая таким образом образование карбинольного основания.

FD&C Красный № 3 является единственным красителем ксантинового типа. Его структура свидетельствует о том, что он нерастворим в кислотах, довольно стоек к действию щелочей и характеризуется сильной флуоресценцией. Его водонерастворимая форма (лак) больше не разрешена к использованию в пищевых продуктах по токсикологическим соображениям. Хотя этот краситель в своей водорастворимой форме внесен в перечень «постоянно разрешенных», его будущее в перспективе вызывает большие сомнения. *FD&C* голубой № 2 является единственным красителем типа индиго. Его получают из индиго, одного из давно известных и широко используемых натуральных красителей. Это красящее вещество получают из различных видов индиго, произрастающих в Индии. До появления синтетического красителя экстракт индиго был одним из основных предметов торговли. *FD&C* Синий № 2 получают путем сульфонирования индиго с образованием 5,5'-индиготиндисульфоната (рис. 9.46). Его цвет по сравнению с зеленовато-голубым *FD&C* Голубой № 1 представляется насыщенным синим. Этот краситель имеет самую низкую растворимость в воде и наименьшую стойкость к действию света среди всех красителей *FD&C*, но он относительно стоек к восстановителям.

Как правило, условиями, вызывающими обесцвечивание или осаждение сертифицированных красителей, являются присутствие восстановителей или тяжелых металлов, действие света, чрезмерное нагревание или действие кислот или щелочей.

В пищевых продуктах можно предотвратить образование условий для потери цвета. Наибольшие затруднения вызывают восстановители. Восстановление хромофоров азо- и трифенилметановых красителей показано на рис. 9.47. Азокрасители восстанавливаются до бесцветной гидразоформы, а иногда — до первичного амина. Трифенилметановые красители восстанавливаются до бесцветного лейкооснования. Распространенными восстановителями в пищевых продуктах являются моносахариды (глюкоза и фруктоза), альдегиды, кетоны и аскорбиновая кислота.

Свободные металлы могут химически соединяться со многими красителями, вызывая обесцвечивание. Наиболее проблемными являются железо и медь, а присутствие кальция и магния может привести к образованию нерастворимых солей и выпадению их в осадок.



Индиго голубой (индиготин)

FD&C Синий № 2 (индигокармин), 5,5′-индиготина дисульфонат

Рис. 9.46. Примеры структур красителей типа индиго

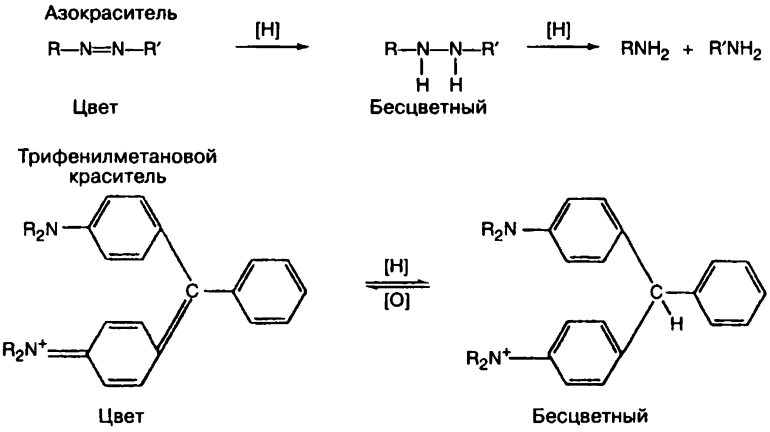


Рис. 9.47. Восстановление азо- и трифенилметановых красителей до бесцветных продуктов

9.3.3. Применение сертифицированных пищевых красителей

У применения синтетических красителей имеются некоторые практические преимущества. В большинстве случаев они обладают высокой окрашивающей способностью, так что для получения желаемого цвета требуются небольшие количества красителя, что благоприятно сказывается на себестоимости. Кроме того, они высокостабильны в переработке и при условиях хранения по сравнению с их натуральными аналогами, а также доступны в водорастворимой (краситель) и водонерастворимой (лак) формах. Повышенная гомогенность при внесении водорастворимого красителя в пищевые продукты достигается путем предварительного растворения красителя в воде. Для предотвращения осаждения следует использовать дистиллированную воду. У производителя можно приобрести жидкие красители различной концентрации, во избежание избыточного окрашивания обычно не превышающей 3%. К жидким препаратам для предотвращения микробиологической порчи обычно добавляют лимонную кислоту или бензоат натрия.

Многие пищевые продукты характеризуются низким содержанием влаги, что делает невозможным полное растворение и однородное распределение окрашивающего вещества. В результате получается бледный цвет и/или эффект пятнистости. Это представляется потенциальной проблемой для леденцовой карамели, содержание влаги в которой составляет менее 1%. Данную проблему решают использованием не воды, а других растворителей типа глицерина или пропиленгликоля (см. табл. 9.13). Еще одним способом решения проблем плохого диспергирования красителей в пищевых продуктах с низким содержанием влаги является использование пищевых лаков, которые в пищевых продуктах присутствуют виде дисперсий, а не в растворе. Содержанию в них красящего вещества варьирует от 1 до 40%. Высокое содержание красящего вещества не всегда дает интенсивный цвет. Ключевое значение имеет размер частиц — чем он меньше, тем тоньше будет дисперсия и более интенсивным цвет. Особые способы помола, используемые производителями красителей, позволяют приготавливать лаки со средним размером частиц менее 1 мкм.

Как и в случае красителей, зачастую требуется приготовить предварительную дисперсию лаков в глицерине, пропиленгликоле или жидких пищевых жирах. Такое предварительное диспергирование спо-

собствует предотвращению агломерации частиц и тем самым повышению интенсивности цвета, а также предотвращению цветовых пятен. Содержание красящих веществ в дисперсиях лаков варьирует от 15 до 35%. В типичной дисперсии лака может содержаться 20% *FD&C* лака А, 20% *FD&C* лака В, 30% глицерина и 30% пропиленгликоля, что дает в результате содержание красящего вещества 16%.

Производители красителей изготавливают также цветные пасты и твердые брикеты красителей или лаков. Пасты для увеличения вязкости изготавливают с добавлением в качестве растворителя, например, глицерина и сахарного песка. Пищевые красители в виде брикетов получают путем добавления к красящим дисперсиям смол и эмульгаторов.

9.3.4. Красители, не подлежащие сертификации*

Ниже мы приведем краткое описание пищевых красителей, перечисленных в табл. 9.11.

Экстракт аннато приготавливается из семян аннато (*Bixa orellana L.*). Для экстракции используются растворители пищевого качества. Как альтернатива применению стандартных органических растворителей прошел испытания сверхкритический диоксид углерода. Эта технология, однако, еще не внедрена в промышленном масштабе. Основным пигментом экстракта аннато является каротиноид биксин. При омылении биксина метильная эфирная группа гидролизуется, и в результате получается норбиксин (рис. 9.48). Биксин и норбиксин различаются по растворимости и образуют основу для соответственно масло- и водорастворимых красителей аннато.

Обезвоженный свекольный экстракт получается обезвоживанием сока цельных корнеплодов свеклы. Пигментами свекольных красящих веществ являются беталаины (красные бетацианины и желтые бетаксантины). Сотношение бетацинанина и бетаксантина обычно варьирует в зависимости от сорта и спелости корнеплодов. Свекольный краситель может также получаться при производстве овощных соков. Этот тип свекольного красителя получают концентрированием свекольного сока под вакуумом до содержания СВ, достаточного для предотвращения порчи (около 60%).

Кантаксантин (β-каротин-4,4′-дион), β-апо-8′-каротиналь и β-каротин представляют собой синтетические каротиноиды и считаются «идентичными натуральным». Их структурные формулы приведены на рис. 9.49.

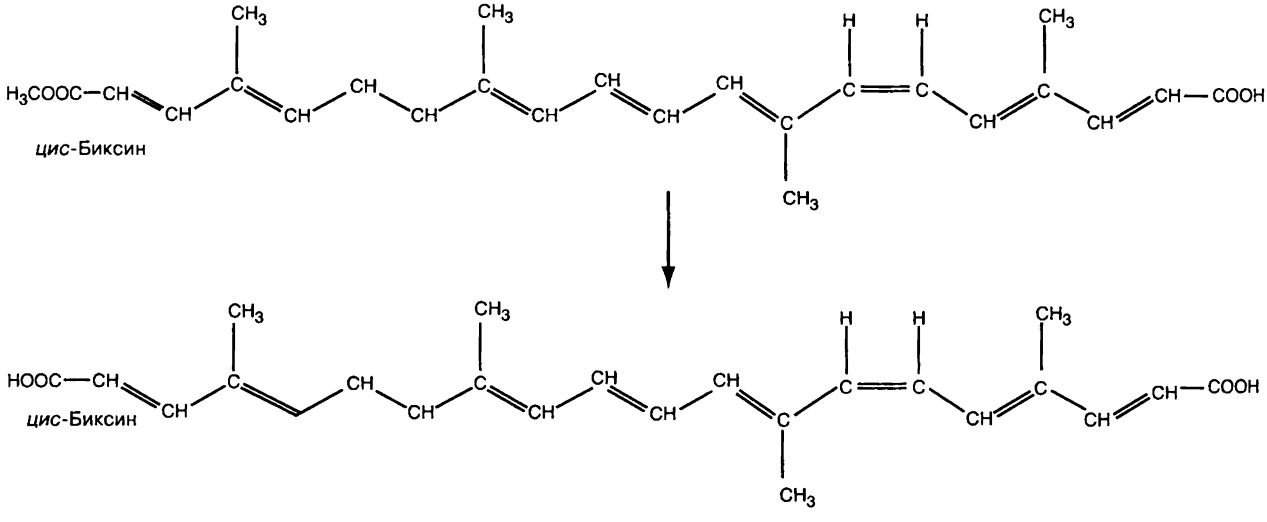
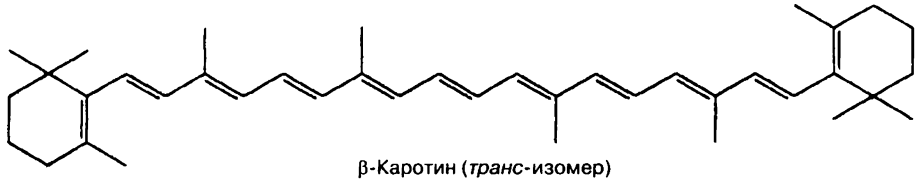
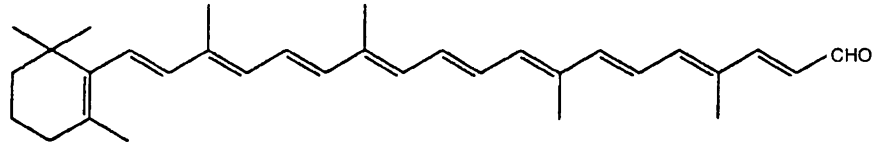


Рис. 9.48. Образование норбиксина из биксина

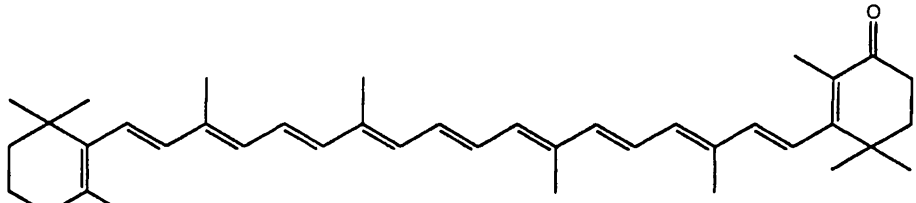
* Приведенные в этом разделе виды красителей в РФ и Евросоюзе также входят в список пищевых добавок-красителей, разрешенных для использования в пищевой промышленности (за исключением обжаренных семян хлопчатника).



β-Каротин (*транс*-изомер)



β-апо-8′-каротиналь (C_{30}) (*транс*-изомер)



Кантаксантин (*транс*-изомер)

Рис. 9.49. Структура каротиноидов, «идентичных натуральным»

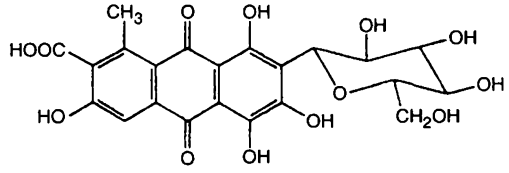


Рис. 9.50. Структура карминовой кислоты

Экстракт кошенили представляет собой концентрат, получаемый из водно-спиртового экстракта выделений насекомого *Dactylopius coccus L. Costa*. Окрашивание преимущественно обусловлено красной карминовой кислотой (рис. 9.50), которая содержится в экстракте в количестве около 2–3%. Кроме того, выпускаются красители с концентрацией карминовой кислоты до 50%, которые реализуются под общим названием карминовых красителей.

Медные комплексы хлорофилла представляют собой порошки разного цвета (от зеленого до черного), приготовливаемые из хлорофилла путем омыления и замещения магния медью. Хлорофилл экстрагируют из люцерны с использованием ацетона, этанола и/или гексана. Этот краситель можно использовать для окрашивания сухих концентратов напитков на базе цитрусовых (не более 0,2% в сухом концентрате).

Сахарный колер является темно-коричневой жидкостью, получаемой в ходе карамелизации углеводов при нагревании.

Обжаренную, частично обезжиренную муку из семян хлопчатника приготавливают следующим образом: семена хлопчатника отделяют от пуха и шелухи, ядра просеивают, провеивают и плющат при соответствующем содержании влаги, после чего мякоть нагревают и отжимают мсло. После тепловой обработки мякоть охлаждают, измельчают и вновь нагревают, получая продукт с цветом от светло- до темно-коричневого.

Глюконат железа (II) представляет собой желтовато-серый порошок с легким запахом, напоминающим жженку.

Лактат железа (II) представляет собой зеленовато-белый порошок, используемый для окрашивания зрелых оливок.

Экстракт из кожицы винограда — это багряно-красная жидкость, получаемая из водного экстракта мезги, остающейся после отжима ягод винограда в целях получения сока. Красящее вещество экстракта состоит в основном из антоцианов. Этот краситель реализуется под торговой маркой «эноцианин» и применяется для окрашивания газированных и негазированных безалкогольных напитков, основ для них и спиртных напитков.

Виноградный экстракт является водным раствором антоциановых пигментов из винограда сорта «Конкорд» или водорастворимым порошком, получаемым выпариванием этого водного раствора. Виноградный экстракт можно использовать для окрашивания пищевых продуктов, не являющихся напитками, если только его добавление не нарушает их стандарт идентичности.

Фруктовые и овощные соки можно использовать как в натуральном виде, так и в виде концентрированных соков. В зависимости от источника сока в них могут содержаться разные пигменты. Широкое распространение получили концентраты свекольного и виноградного соков. Концентрат виноградного сока в отличие от экстракта кожицы винограда может использоваться в пищевых продуктах, не являющихся напитками.

Морковное масло получают экстрагированием пищевой моркови гексаном. Гексан впоследствии удаляется при дистилляции в вакууме. Здесь основным красящими веществами являются α- и β-каротин, а также другие минорные каротиноиды моркови.

Паприка или олеосмолы (*маслосмолы, олеорезины*) *паприки* представляют собой либо измельченные сухие стручки паприки (*Capsicum annum L.*) или экстракт этого растения. При производстве терпентина (скипидара) могут использоваться несколько растворителей. Основным красящими веществом в паприке является каротиноид капксантин.

Рибофлавин (витамин B_2) представляет собой желто-оранжевый порошок и является естественным пигментом молока.

Шафран — это сушеные рыльца пестиков *Crocus sativul L.* Его желтый цвет обусловлен кроцином (дигентиобиозидом кроцетина).

Оксид титана в настоящее время является наиболее белым пигментом. В нем зачастую присутствует диоксид кремния или алюминия, облегчающие диспергирование в пищевых продуктах, но их содержание не должно превышать 2%.

Куркума и олеосмолы (*маслосмолы, олеорезины*) *куркумы* — это либо измельченное корневище, либо экстракт куркумы (*Curcuma longa L.*). Красящим веществом в куркуме является куркумин. В производстве олеосмол куркумы можно использовать разные органические растворители.

К прочим пищевым красителям, не требующим спецификации, относятся астаксантин, ультрамариновый синий, водоросль гематококкус, окись железа, мука из сушеных водорослей рода *Spongiococcum,* мука из бархатцев (высушенные и измельченные лепестки цветов *Aztic marigold, Tagetes erecta L.*), масло из эндосперма кукурузы и дрожжи рода *Phqffia.* Большого интереса для нас они не представляют, поскольку их использование ограничено кормами для животных, но опосредованно они могут, тем не менее, влиять на цвет пищевых продуктов.

Указание на этикетке о присутствии красителей, не требующих сертификации, вопрос несколько дискуссионный. Хотя такие красители получают из натуральных источников или они идентичны натуральным, их следует указывать в перечне искусственных красителей, так как в подавляющем большинстве случаев добавляемое красящее вещество не является нативным для данного пищевого продукта. При этикетировании пищевых продуктов в США красители, не требующие сертификации, должны быть указаны на этикетке*

* Поскольку все виды красителей в России относятся к пищевым добавкам, действующие нормативы требуют указывать их на этикетках пищевых продуктов.— *Примеч. науч. ред.*

9.3.5. Использование красителей, не требующих сертификации

За исключением синтетических красителей, идентичных натуральным, не требующие сертификации красящие вещества являются химически неочищенными препаратами. Они представляют собой либо совершенно неочищенные материалы, либо необработанные растительные или животные экстракты. Из-за присутствия в них примесей для получения желаемого цвета требуется относительно большое их количество, что позволяет сделать вывод о недостаточной окрашивающей способности этих красителей и о нежелательности внесения с ними в продукт вкусоароматических веществ. Эти соображения, однако, верны отнюдь не всегда. Многие чистые натуральные пигменты обладают высокой окрашивающей способностью, что можно проиллюстрировать путем сравнения коэффициентов светопоглощения 1%-ного раствора натурального пигмента и такого же раствора синтетического красителя. Длины волн максимума светопоглощения $A^{1\%}_{1см}$ для *FD&C* Красный № 40 и Желтый № 6 составляют соответственно 586 и 569 нм, тогда как для бетанина, основного пигмента свекольного порошка, и β-каротина они составляют соответственно 1120 и 2400 нм. Более того, большинство чистых пигментов не меняют вкуса продукта. Недостаток окрашивающей способности и возможное изменение вкуса у неочищенных натуральных красящих веществ компенсировать путем применения современных технологий разделения и очистки. К сожалению, некоторые из таких технологических инноваций еще не получили разрешения на промышленное применение.

Спрос на более безопасные и полезные для здоровья пищевые продукты вызвал повышение спроса на пищевые красители из натуральных источников. Полезность для здоровья, ассоциируемая со многими природными красителями, сделала их более привлекательными, чем использование синтетических красителей. Все это в сочетании с ужесточением нормативных актов и ростом осведомленности потребителей может привести к повышению заинтересованности пищевиков в применении красителей из натуральных источников.

Дополнительная литература

Bauernfeind J. B. (ed.). Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. — NY: Academic Press, 1981.

Counsell J. N. (ed.). *Natural Colours for Food and Other Uses.* — Essex: Applied Science, 1981.

Francis F. J. *Colorants. Practical Guide for the Food Industry.* —St Paul, Minnesota: Eagan Press, 1999. — (Eagan Press Handbook Series).

Hendry G. A. F., Haughton J. D. (eds). *Natural Food Colorants.* — NY: Van Nostrand Reinhold, 1992.

Hutchings J. B. *Food Colour and Appearance.* — London: Blackie, 1994.

Laura G. J., Francis F. J. (eds). *Natural Food Colorants.* — NY: Marcel Dekker, Inc., 2000. —(IFT Basic Symposium Series).

Marmion D. M. Handbook of U.S. Colorants for Foods, Drugs and Cosmetics. — NY: John Wiley & Sons, 1979.

Mazza G., Miniati E. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.

Schwartz S. J., Lorenzo T. V. *Chlorophylls in Foods. Food Science and Nutrition.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

Walford J. (ed.). *Developments in Food Colours*–1. — London: Elsevier Applied Science, 1980.

Walford J. (ed.). *Development in Food Colours*–2. — London: Elsevier Applied Science, 1984.

Литература

1. Adams J. B. Colour stability of red fruits // *Food Manufact.*, 1973, 48(2), p. 19–20, 41.
2. Andersen O. M. Anthocyanin occurrences and analyses // *Proceedings from the 1st International Workshop on Anthocyanins,* April 17–19, Adelaide, Australia, 2002.
3. Attoe E. L., von Elbe J. H. Oxygen involvement in betanin degradation: Effect of antioxidants // *J. Food Sci.*, 1984, 50, p. 106–110.
4. Awika J. M., Rooney L. W., Waniska R. D. Properties of 3-deoxyanthocyanins from Sorghum // *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p. 4388–4394.
5. Bacon M. F., Holden M. Changes in chlorophylls resulting from various chemical and physical treatments of leaf extracts // *Phytochem.*, 1967, 6, p. 193–210.
6. Bakker J., Timberlake C. F. Isolation, identification, and characterization of new colorstable anthocyanins occurring in some red wines // *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, p. 35–43.
7. Bauernfeind J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds // *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20, p. 456–473.
8. Ben Aziz A., Grossman S., Ascarelli I., Budowski P. Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method // *Phytochem.*, 1971, 10, p. 1445–1452.

9. Bilyk A., Kolodijand M. A., Sapers G. M. Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid // *J. Food Sci.* 1981, 46, p. 1616–1617.
10. Blair J. S. Color stabilization of green vegetables. — U.S. Patent 2 186 003, March 3, 1937.
11. Brenes P., Garcia Duran M. C., Garrido A. Concentration of phenolic compounds in storage brines or ripe olives // *J. Food Sci.*, 1993, 58, p. 347–350.
12. Brewer S. Irradiation effects on meat color — a review // *Meat Sci.*, 2004, 68, p. 1–17.
13. Bridle P., Scott K. G., Timberlake C. F. Anthocyanins in *Salix* species. Anew anthocyanin in *Salix purpurea* bark // *Phytochem.*, 1973, 12, p. 1103–1106.
14. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Preface // *Carotenoids Handbook* / G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander (eds). — Basel, Boston: Birkhauser Verlag, 2004.
15. Brouillard R. Chemical structures of anthocyanins // *Anthocyanins as Food Colors* / P. Markakis (ed.). — NY: Academic Press, 1982. — P. 1–40.
16. Buckle K. A., Edwards R. A. Chlorophyll: Color and pH changes in HTST processed green pea puree // *J. Food Technol.*, 1979, 5, p. 173–186.
17. Burton G. W. Antioxidant action of carotenoids // *J. Nutr.*, 1989, 119, p. 109–111.
18. Burton G. W., Ingold K. U. Beta-carotene: An unusual type of lipid antioxidant // *Science*, 1984, 224, p. 569–573.
19. Canjura F. L., Schwartz S. J. Separation of chlorophyll compounds and their polar derivatives by high-performance liquid chromatography // *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, p. 1102–1105.
20. Canjura F. L., Schwartz S. J., Nunes R. V. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides // *J. Food Sci.*, 1991, 56, p. 1639–1643.
21. Canfield L. M., Krinsky N. I., Olson J. A. *Carotenoids in Human Health.* — Vol. 691. — NY: New York Academy of Sciences, 1993.
22. Clydesdale F. M., Fleischmann D. L., Francis F. J. Maintenance of color in processed green vegetables // *Food Prod. Dev.*, 1970, 4, p. 127–138.
23. Clydesdale F. M., Lin Y. D., Francis F. J. Formation of 2-pyrroldone-S-carboxylic acid from glutamine during processing and storage of spinach puree // *J. Food Sci.*, 1972, 37, p. 45–47.
24. Cohen E., Saguy I. Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments // *J. Food Sci.* 1983, 48, p. 703–707.
25. Craft N. E. Chromatographic techniques for carotenoids separation (Ch. F2.3) // *Handbook of Food Analytical Chemistry* / R. E. Wrolstad, E. A. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith, P. Sporns (eds). — Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2005. — P. 91–105.
26. Daravingas G., Cain R. F. Changes in anthocyanin pigments of raspberries during processing and storage // *J. Food Sci.* 1965, 33, p. 400–405.
27. Davidson J. Procedure for the extraction, separation, and estimation of major fat-soluble pigments of hay // *J. Sci. Food Agric.*, 1954, 5, p. 1–7.
28. Davies W. J., Zhang J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil // *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, 1991, 42, p. 55–76.
29. Delgado-Vargas R., Jimenez A. R., Paredes-Lopez O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2000, 40(3), p. 73–289.
30. Di Mascio P., Kaiser S., Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 274, p. 532–538.
31. Downham A., Collins P. Colouring our foods in the last and next millennium // *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2000, 35(1), p. 5–22.
32. Emenhiser C., Sander L. C., Schwartz S. J. Capability of polymeric C30 stationary phase to resolve *cis-trans* carotenoids isomers in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr.*, 1999, 707A, p. 205–216.
33. Falk J. E., Phillips J. N. Physical and coordination chemistry of the tetrapyrrole pigments // *Chelating Agents and Metal Chelates* / F. P. Dwyer, D. P. Mellor (eds). — NY: Academic Press, 1964. — P. 441–490.
34. Faustman C., Chan W. K. M., Schaefer D. M., Havens A. Beef color update: The role for vitamin E // *J. Anim Sci.*, 1998, 76, p. 1019–1026.
35. Faustman C., Cassens R. G. The biochemical basis of discoloration in fresh meat: A review // *J. Muscle Foods*, 1990, 1, p. 217–243.
36. Faustman C., Cassens R. G., Schaeffer D. M., Buege D. R., Scheller K. K. Improvement of pigment and lipid stability in Holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin E // *J. Food Sci.*, 1989, 54, p. 858–862.
37. Ferruzzi M. G., Schwartz S. J. Chromatographic separation of chlorophylls (Ch. F4.4) // *Handbook of Food Analytical Chemistry* / R. E. Wrolstad, E. A. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith, P. Sporns (eds.). — Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2005. — P. 179–189.
38. Fischbach H. Microdeterminations for organically combined metal in pigment of okra // *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 1943, 26, p. 139–143.
39. Foote C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation // *Science*, 1968, 162, p. 963–970.

40. Forrest J. C., Aberle E. D., Hedrick H. B., Judge M. D., Merkel R. A. *Principles of Meat Science.* — San Francisco: W. H. Freeman, 1975.
41. Forsyth W. G. C., Roberts J. B. Cocoa «leucocyanidin» // *Chem. Ind. (Lond.),* 1958, p. 755.
42. Fossen T., Cabrita L., Andersen O. M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region // *Food Chem.,* 1998, 63(4), p. 435–440.
43. Fox J. B., Jr. The chemistry of meat pigments // *J. Agric. Food Chem.,* 1966, 14, p. 207–210.
44. Fox J. B., Jr., Ackerman S. A. Formation of nitric oxide myoglobin: Mechanisms of the reaction with various reductants // *J. Food Sci.,* 1968, 33, p. 364–370.
45. Francis F. J. *Colorants.* — St Paul, Minnesota, USA: Eagan Press, 1999. — (Handbook Series).
46. Francis F. J. Anthocyanins // *Current Aspects of Food Colorants* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1977. — P. 19–27.
47. Frankel E. N. The antioxidant and nutritional effects of tocopherols, ascorbic acid and β-carotene in relation to processing of edible oils // *Nutritional Impact of Food Processing* / J. C. Somogyi, H. R. Muller (eds). — Basel: Karger, 1989. — P. 297–312. — (Bibl. Nutr. Dieta).
48. Fulcrand H., Benabdeljalil C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins // *Phytochem.,* 1998, 47, p. 1401–1407.
49. Geis I. Proteins III: structure and function // *Biochemistry* / F. B. Armstrong (ed.). — 2nd ed. — NY: Oxford University Press, 1983. — P. 108.
50. Giusti M. M., Wrolstad R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems // *Biochem. Eng. J.,* 2003, 14(3), p. 217–225.
51. Giusti M. M., Wrolstad R. E. Characterization of red radish anthocyanins // *J. Food Sci.,* 1996, 61, p. 322–326.
52. Goodman L. P., Markakis P. Sulfur dioxide inhibition of anthocyanin degradation by phenolase // *J. Food Sci.* 1965, 130, p. 135–137.
53. Goodwin T. W. Functions of carotenoids // *The Biochemistry of the Carotenoids* / T. W. Goodwin (ed.). — Vol. 1. — 2nd ed. — NY: Chapman and Hall, 1980. — p. 77–95.
54. Govindarajan S., Hultin H. O., Kotula A. W. Myoglobin oxidation in ground beef: Mechanistic studies // *J. Food Sci.,* 1977, 42, p. 571–577, 582.
55. Gross J. Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids. — NY: Van Nostrand Reinhold, 1991.
56. Gupte S. M., El-Bisi H. M., Francis F. J. Kinetics of thermal degradation of chlorophyll in spinach puree // *J. Food Sci.* 1964, 29, p. 379–382.
57 Hagler L., Coppes R. I., Herman R. H. Metmyoglobin reductase. Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from bovine heart which reduces metmyoglobin // *J. Biol. Chem.,* 1979, 254, p. 6505–6514.
58. Haisman D. R., Clarke M. W. The interfacial factor in heat induced conversion of chlorophyll to pheophytin in green leaves // *J. Sci. Food Agric.,* 1975, 26, p. 1111–1126.
59. Herbach K. M., Stintzing F. C., Carle R. Quantitative and structural changes of betacyanins in red beet *(Beta vulgaris* L.) juice induced by thermal treatment // *Pigments in Foods, more than Colours* / L. Dufose (ed.). — Qimper, France: Le Berre Imprimeur, 2004.
60. Holt A. S. The phase test intermediate and the allomerization of chlorophyll *a* // *Can. J. Biochem. Physiol.,* 1958, 36, p. 439–456.
61. Huang A. S., von Elbe J. H. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine // *J. Food Sci.,* 1985, 50, p. 1115–1120, 1129.
62. Huang A. S. von Elbe J. H. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine // *J.Food Sci.,* 1987, 52, p. 1689–1693.
63. Humphry A. M. Chlorophyll // *Food. Chem.,* 1980, 5, p. 57–67.
64. Hunt M. C., Sorheim O., Slinde E. Color and heat denaturation of myoglobin forms in ground beef // *J. Food Sci.,* 1999, 64, p. 847–851.
65. Hyvarinen K., Hynninen P. H. Liquid chromatographic separation and mass spectrometric identification of chlorophyll *b* allomers // *J. Chromat.,* 1999, 837A, p. 107–116.
66. Isler O. *Carotenoids.* — Basel: Birkhauser Verlag, 1971.
67. Nomenclature of carotenoids / IUPAC–IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry) // *Pure Appl. Chem.,* 1975, 41, p. 407–419.
68. Jackman R. L., Smith J. L. Anthocyanins and betalains // *Natural Food Colorants* / G. A. F. Hendry, J. D. Houghton (eds.). — NY: Chapman and Hall, 1996. — P. 244–369.
69. Jackson A. H. Structure, properties and distribution of chlorophyll // *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* / T. W. Goodwin (ed.). — Vol. 1. — 2nd ed. — NY: Academic Press, 1976. — P. 1–63.
70. Food Additives: List of designated additives / The Japan Food Chemical Research Foundation. — http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/eng.h-page); access April 10, 2005.
71. Jen J. J., Mackinney G. On the photodecomposition of chlorophyll *in vitro.* I. Reaction rates // *Photochem. Photobiol.,* 1970, 11, p. 297–302.

72. Jen J. J., Mackinney G. On the photodecomposition of chlorophyll *in vitro*. II. Intermediates and breakdown products // *Photochem. Photobiol.* 1970, 11, p. 303–308.
73. Jones I. D., White R. C., Gibbs E., Butler L. S., Nelson L. A. Experimental formation of zinc and copper complexes of chlorophyll derivatives in vegetable tissue by thermal processing // *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25, p. 149–153.
74. Jones I. D., White R. C., Gibbs E., Denard C. D. Absorption spectra of copper and zinc complexes of pheophytins and pheophorbides // *J. Agric. Food Chem.*, 1968, 16, p. 80–83.
75. Khachik R., Beecher G. R., Whittaker N. F. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography // *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34, p. 603–616.
76. Killinger K. M., Hunt M. C., Campbell R. E., Kropf D. H. Factors affecting premature browning during cooking of store purchased ground beef // *J. Food Sci.*, 2000, 65, p. 585–587.
77. Kearsley M. W., Rodriguez N. The stability and use of natural colours in foods: Anthocyanin, β-carotene, and riboflavin // *J. Food Technol.*, 1981, 16, p. 421–431.
78. Krinsky N. I. Antioxidant functions of carotenoids // *Free Radic. Biol. Med.*, 1989, 7, p. 617–635.
79. Krinsky N. I., Mayne S. T., Sies H. *Carotenoids in Health and Disease.* — NY: Marcel Dekker, 2004.
80. Kropf D. H. Effects of retail display conditions on meat color // *Proc. Recip. Meat Conf.*, 1980, 33, p. 15–32.
81. La Borde L. F., von Elbe J. H. Zinc complex formation in heated vegetable purees // *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, p. 484–487.
82. La Borde L. F., von Elbe J. H. Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables // *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, p. 1100–1102.
83. La Borde L. F., von Elbe J. H. Effect of solutes on zinc complex formation in heated green vegetables // *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, p. 1096–1099.
84. Lawrie R. A. *Meat Science.* — 4th ed. — NY: Pergamon Press, 1985.
85. Livingston D. J., Brown W. D. The chemistry of myoglobin and its reactions meat pigments, food quality indices // *Food Technol.*, 1981, 35(5), p. 238–252.
86. Llewellyn C. A., Mantoura R. F. C., Brereton R. G. Products of chlorophyll photodegradation. 1. Detection and separation // *Photochem. Photobiol.*, 1990, 52, p. 1037–1041.
87. Llewellyn C. A., Mantoura R. F. C., Brereton R. G. Products of chlorophyll photodegradation. 2. Structural identification // *Photochem. Photobiol.*, 1990, 52, p. 1043–1047.
88. Loef H. W., Thung S. B. Ueber den Einfluss von Chlorophyllase auf die Farbe von Spinat waehrend und nach der Verwertung // *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1965, 126, p. 401–406.
89. Luh B. S., Leonard S. J., Patel D. S. Pink discoloration in canned Barlett pears // *Food Technol.*, 1960, 14, p. 53–56.
90. Luh B. S., Leonard S., Simone M., Villarreal F. Aseptic canning of foods. VII. Strained lima beans // *Food Technol.*, 1964, 18, p. 363–366.
91. Lufio M., Roncales P., Djenane D., Beltran J. A. Beef shelf life in low O_2 and high CO_2 atmospheres containing different low CO concentrations // *Meat Sci.*, 2000, 55, p. 413–419.
92. Madhavi D. L., Carpenter C. E. Aging and processing affect color, metmyoglobin reductase and oxygen consumption of beef muscles // *J. Food. Sci.*, 1993, 58, p. 939–942, 947.
93. Malecki G. J. Blanching and canning process for green vegetables. — U.S. Patent 3 183 102, June 19, 1961.
94. Malecki G. J. Processing of green vegetables for color retention in canning. — U.S. Patent 4 104 410, September 9, 1976.
95. Markakis P. Stability of anthocyanins in foods // *Anthocyanins as Food Colors* / P. Markakis (ed.). — NY: Academic Press, 1982. — P. 163–180.
96. Markakis P., Livingstone G. E., Fellers R. C. Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation // *Food Res.*, 1957, 22, p. 117–130.
97. Mazza G., Miniati E. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.
98. McFeeters R. F. Substrate specificity of chlorophyllase // *Plant Physiol.*, 1975, 158, p. 377–381
99. Mikkelson A., Juncher D., Skibsted L. F. Metmyoglobin reductase activity in porcine *M. longissimus dorsi* muscle // *Meat Sci.*, 1999, 42, p. 277–288.
100. Nakatani H. Y., Barber J., Forrester J. A. Surface charges on chloroplast membranes as studied by particle electrophoresis // *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 504, p. 215–225.
101. Okayama T. Effect of modified gas atmosphere packaging after dip treatment on myoglobin and lipid oxidation of beef steaks // *Meat Sci.*, 1987, 19, p. 179–185.
102. O'Neil C. A., Schwartz S. J. Chromatographic analysis of *cis/trans* carotenoid isomers // *J. Chromatogr.*, 1992, 624, p. 235–252.
103. Osborn H. M., Brown H., Adams J. B., Ledward D. A. High temperature reduction of metmyoglobin in aqueous muscles extracts // *Meat Sci.*, 2003, 65, p. 631–637.
104. Palozza P., Krinsky N. I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro:* An overview // *Methods Enzymol.*, 1992, 213, p. 403–421.
105. Parry A. D., Horgan R. Abscisic acid biosythesis in roots: The identification of potential abscisic acid precursors, and other carotenoids // *Planta*, 1992, 187, p. 185–191.

106. Pasch J. H., von Elbe J. H. Betanine degradation as influenced by water activity // *J. Food Sci.*, 1975, 44, p. 72–73.
107. Pegg R. B., Shahidi F. Unraveling the chemical identity of meat pigments // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, 31(6), p. 561–589.
108. Peng C. Y., Markakis P. Effect of prenolase on anthocyanins // *Nature (Lond.)*, 1963, 199, p. 597–598.
109. Pennington F. C., Strain H. H., Svec W. A., Katz J. J. Preparation and properties of pyrochlorophyll a, methyl pyrochlorophyllide *a*, pyropheophytin *a*, and methyl pyropheophorbide a derived from chlorophyll by decarbomethoxylation // *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, p. 1418–1426.
110. Peiser G. D., Yang S. F. Sulfite-mediated destruction of β-carotene // *J. Agric. Food Chem.*, 1979, 27, p. 446–449.
111. Peto R., Doll R., Buckley J. D., Sporn M. B. Can dietary betacarotene materially reduce human cancer rates? // *Nature*, 1981, 290, p. 201–208.
112. Piatelli M., Minale L., Prota G. Pigments of Centospermae–III. Betaxanthines from *Beta vulgaris* L. // *Phytochem.*, 1965, 4, p. 121–125.
113. Piatelli M., Minale L., Nicolaus R. A. Pigments of Centrospermae–V. Betaxanthines from *Mirabilis jalapa* L. // *Phytochem.*, 1965, 4, p. 817–823.
114. Rock C. L., Lovalvo J. L., Emenhiser C., Ruffin M. T., Flatt S. W., Schwartz S. J. Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women // *J. Nutr.*, 1998, 128(5), p. 913–916.
115. Sante V., Renerre M., Lacourt A. Effect of modified gas atmosphere packaging on color stability and on microbiology of turkey breast meat // *J. Food Qual.*, 1994, 17, p. 177–195.
116. Schanderl S. H., Chichester C. O., Marsh G. L. Degradation of chlorophyll and several derivatives in acid solution // *J. Org. Chem.*, 1962, 27, p. 3865–3868.
117. Schanderl S. H., Marsh G. L., Chichester C. O. Color reversion in processed vegetables. I. Studies on regreened pea puree // *J. Food Sci.* 1965, 30, p. 312–316.
118. Schoefs B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis // *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, 13(11), p. 361–371.
119. Schwartz S. J. Pigment analysis // *Introduction to the Chemical Analysis of Foods* / S. Nielson (ed.). — Boston: Jones and Bartlett, 1994. — P. 261–271.
120. Schwartz S. J., Lorenzo T. V. Chlorophyll stability during aseptic during processing and storage // *J. Food Sci.*, 1991, 56, p. 1056–1062.
121. Schwartz S. J., von Elbe J. H. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables // *J. Food Sci.*, 1983, 48, p. 1303–1306.
122. Schwartz S. J., Woo S. L., von Elbe J. H. High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach // *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, p. 533–535.
123. Schwarz M., Quast P., Von Baer D., Winterhalter P. Vitisin A content in Chilean wines from *Vitis vinifera* Cv. Cabernet Sauvignon and contribution to the color of aged red wines // *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 6261–6267.
124. Scott K. J. Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC // *Food Chem.*, 1992, 45, p. 357–364.
125. Seely G/ R. The structure and chemistry of functional groups // *The Chlorophylls* / L. P. Vernon, G. R. Seely (eds). — NY: Academic Press, 1996. — P. 67–109.
126. Segner W. P., Ragusa T. J., Nank W. K., Hayle W. C. Process for the preservation of green color in canned vegetables. — U.S. Patent 4 473 591, December 15, 1982.
127. Seidman S. C., Durland P. R. The utilization of modified gas atmosphere packaging in fresh meat: A review // *J. Food Qual.*, 1984, 6, p. 239–252.
128. Shi Z., Lin M., Francis F. J. Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida* // *J. Food Sci.*, 1992, 57, p. 758–759.
129. Shrikhande A. J., Francis F. J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems // *J. Food Sci.*, 1974, 39, p. 904–906.
130. Sies H., Stahl W., Sundquist A. R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992, 669, p. 7–20.
131. Starr M. S., Francis F. J. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanins pigments in cranberry juice // *Food Technol.* 1968, 22, p. 1293–1295.
132. Strain H. H., Thomas M. F., Katz J. J. Spectral absorption properties of ordinary and fully deuteriated chlorophylls *a* and *b* // *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 75, p. 306–311.
133. Straub O. *Key to Carotenoids* / H. Pfander, M. Gerspacher, M. Rychener, R. Schwabe (eds). — 2nd ed. —Boston: Birkhauser Verlag, 1987.
134. Struck A., Cmiel E., Schneider S., Scheer H. Photochemical ring-opening in mesochlorinated chlorophylls // *Photochem. Photobiol.*, 1990, 51, p. 217–222.
135. Sweeny J. G., Martin M. E. Determination of chlorophyll and pheophytin in broccoli heated by various procedures // *Food Res.*, 1958, 23, p. 635–647.
136. Sweeny J. G., Wilkinson M. M., Iacobucci G. A. Effect of flavonoid sulfonates on the photobleaching of anthocyanins in acid solution // *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, p. 563–567.

137. Swiski M. A., Alloug R., Fuimard A., Cheftel H. A water-soluble green pigment, originating during processing of canned brussels sprouts picked before the first autumn frost // *J. Agric. Food Chem.,* 1969, 17, p. 799–801.
138. Tan C. T., Francis F. J. Effect of processing temperature on pigments and color of spinach // *J. Food Sci.,* 1962, 27, p. 232–240.
139. Tee E.-S., Lim C.-L. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods // *Food Chem.,* 1991, 41, p. 309–339.
140. Terahara N., Oda M., Matsui T., Osajima Y., Saito N., Toki K., Honda T. Five new anthocyanins, ternatins A3, B4, B3, B2, and D2, from *Clitoria tematea* flowers // *J. Nat. Prod.,* 1996, 59, p. 139–144.
141. Tewari G., Jayas D. S., Jeremiah L. E., Holley R. A. Prevention of transient discoloration of beef // *J. Food Sci.,* 2001, 66, p. 506–510.
142. Tonucci L. H., von Elbe J. H. Kinetics of the formation of zinc complexes of chlorophyll derivatives // *J. Agric. Food Chem.,* 1991, 40, p. 2341–2344.
143. Unlu Z. N., Clinton S. K., Schwartz S. J. Absorption of lycopene isomers following single meals containing tomato sauces with varying isomer patterns // *FASEB J.,* 2003, 17(5), p. A756–A757.
144. Updike A., Schwartz S. J. Thermal processing of vegetables increases *cis*-isomers of lutein and zeaxanthin // *J. Agric. Food Chem.,* 2003, 51, p. 6184–6190.
145. Van Buren J. P., Bertino J. J., Robinson W. B. The stability of wine anthocyanins on exposure to heat and light // *Am. J. Enol. Vitic.,* 1968, 19, p. 147–154.
146. von Elbe J. H. Factors affecting the color stability of cherry pigments and cherry juice: PhD thesis. — Madison: University of Wisconsin, 1963.
147. von Elbe J. H., Huang A. S., Attoe E. L., Nank W. K. Pigment composition and color of conventional and Veri-Green canned peas // *J. Agric. Food Chem.,* 1986, 34, p. 52–54.
148. von Elbe J. H., LaBorde L. F. Chemistry of color improvement in thermally processed green vegetables // *Quality Factors of Fruit and Vegetables Chemistry and Technology* / J. J. Jen (ed.). — Washington, D.C., 1989. — P. 12–28. — (Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 405).
149. van het Hof K. H., de Boer B. C. J., Tijburg L. B. M., Lucius B. R. H. M., Zijp I., West C. E., Hautvast J. G. A. J. Weststrate J. A. Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption // *J. Nutr.,* 2000, 130(5), p. 1189–1196.
150. Wakamatsu J., Nishimura T., Hattori A. A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in parma ham // *Meat Sci.,* 2004, 67, p. 95–100.
151. Watanaba T., Nakazato M., Mazaki H., Hongu A., Kono M., Saitoh S., Kenichi H. Chlorophyll a epimer and pheophytin *a* in green leaves // *Biochim. Biophys. Acta,* 1985, 807, p. 110–117.
152. Wettasinghe M., Boiling B., Plhak L., Xiao H., Parkin K. Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beetroot *(Beta vulgaris* L.) extracts fromphenotypes of different pigmentation // *J. Agric. Food Chem.,* 2002, 50, p. 6704–6709.
153. Young A. J., Phillip D. M., Lowe G. M. Carotenoid antioxidant activity (Ch. 5) // *Carotenoids in Health and Disease* / N. I. Krinsky, S. T. Mayne, H. Sies (eds). — NY: Marcel Dekker, 2004. — P. 105–126.
154. Zechmeister L. Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes. — NY: Academic Press, 1962.

10. ВКУСОАРОМАТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

Роберт Линдсей (Robert C. Lindsay)
Перевод И. С. Горожанкиной под науч. ред. д-ра хим. наук, проф. К. И. Эллера

Содержание

10.1. Введение. . 588
10.1.1. Общая концепция . . 588
10.1.2. Методы анализа вкусоароматических соединений . . 589
10.1.3. Органолептическая оценка ароматов . . 590
10.1.4. Молекулярные механизмы восприятия вкуса и аромата. . . 590
10.2. Вкусовые и вкусообразующие вещества. . . 592
10.2.1. Сладкие вещества. . . 592
10.2.2. Горькие вещества . 593
10.2.3. Соленые вещества . . . 598
10.2.4. Кислые вещества . 599
10.2.5. Вещества со вкусом умами 599
10.2.6. Вещества со вкусом кокуми и прочие модификаторы вкуса . 600
10.2.7. Жгучие вещества 602
10.2.8. Вещества освежающего действия . 603
10.2.9. Вяжущие вещества. . 603
10.3. Вкусоароматические вещества плодов, овощей и специй. . . 604
10.3.1. Серосодержащие летучие вещества в растениях рода луковых . 604
10.3.2. Серосодержащие летучие вещества растений семейства крестоцветных. . . . 606
10.3.3. Уникальное серосодержащее соединение в грибах шиитаке 606
10.3.4. Метокси-алкилпиразиновые летучие соединения овощей 607
10.3.5. Ферментативно образующиеся летучие соединения жирных кислот. . . . 607
10.3.5.1. Ароматические соединения растений, образовавшиеся в результате действия липоксигеназы . . 608
10.3.5.2. β-окисление высокомолекулярных жирных кислот с образованием летучих соединений 608
10.3.6. Летучие вещества из аминокислот с разветвленной цепью . . . 609
10.3.7. Ароматические вещества, образующиеся по метаболическому пути шикимовой кислоты . . 609
10.3.8. Роль летучих терпеноидов в формировании вкуса и аромата. . . . 610
10.3.9. Ароматические соединения цитрусовых 611
10.3.10.Вкусоароматические вещества трав и специй. 612
10.4. Вкусоароматические продукты молочнокислого и спиртового брожения. 614
10.5. Ароматические летучие вещества жиров и масел . . 615
10.5.1. Вкусоароматические вещества, образующиеся при гидролизе жиров и масел 616
10.5.2. Характерные вкусоароматические продукты расщепления высокомолекулярных ПНЖК . . . 616
10.6. Ароматические летучие соединения молока и мясных продуктов . 617
10.6.1. Видоспецифичные ароматические соединения мяса и молока жвачных животных 618
10.6.2. Видоспецифичные ароматические соединения мяса нежвачных животных. . 618
10.6.3. Летучие соединения в рыбо- и морепродуктах 620

10.7. Образование ароматических летучих соединений при химических реакциях в ходе переработки 621
10.7.1. Вкусоароматические вещества тепловой обработки ... 622
10.7.2. Образование летучих соединений при окислительном расщеплении каротиноидов 625
10.8. Перспективы химии и технологии вкусоароматических соединений 626
Дополнительная литература 627
Литература 627

10.1. Введение

10.1.1. Общая концепция

Химия вкусоароматических веществ обычно воспринимается как относительно новое направление в пищевой химии. Она начала развиваться с конца 1950-х гг. с появлением газовой хроматографии и масс-спектрометрии быстрого сканирования. Несмотря на то что такое приборное оснащение дало возможность исследовать полный диапазон вкусоароматических веществ, во многих более ранних исследованиях изящно применялись методы классической химии, особенно в части эфирных масел и экстрактивных веществ специй и пряностей [28]. Эта несколько обособленная направленность на парфюмерные аспекты в сочетании с ускоренным развитием химии пищевых ароматизаторов способствовала постепенному становлению химии вкусоароматических веществ как отдельного научного направления.

Хотя вкусоароматические соединения по своей химической структуре очень разнообразны и образуются почти из любых компонентов пищевых продуктов, единственным необходимым условием для включения молекулы в предмет пищевой химии остается свойство «стимуляции вкусовых или обонятельных рецепторов или специализированных нервных волокон, продуцирующих интегрированный физиологическую ответную реакцию, известную как флейвор»* Благодаря своему более широкому охвату термин «флейвор» стал использоваться для обозначения полного суммарного восприятия всех ощущений в процессе употребления пищи (запах, вкус, внешний вид, тактильные ощущения и звук). Несмотря на то что зачастую на восприятие флейвора и, следовательно, на приемлемость пищевых продуктов для потребителя существенно влияют ощущения, напрямую не связанные с химией (внешний вид, звук и тактильное ощущение), подробное их рассмотрение выходит за рамки данной главы.

В этой главе основное внимание мы уделим химическим веществам, вызывающим специализированные реакции, связанные с запахом и/или вкусом, причем четким различием между этими понятиями и значением понятия «флейвор» мы иногда будем пренебрегать. Мы рассмотрим химию важнейших вкусоароматических систем и характерных соединений, способных проиллюстрировать химические особенности соответствующих пищевых систем и химические основы существования вкусоароматических соединений в пищевых продуктах. При наличии соответствующей информации мы будем обращать внимание на связь структуры вкусоароматических соединений с их активностью.

Несколько меньше внимания мы уделим профилям вкусоароматических соединений, присутствующих в различных пищевых продуктах. Подробные перечни таких вкусоароматических соединений приводятся в работах [49, 84], а табличные данные пороговых концентраций отдельных соединений — в работе [21]. Кроме того, определенная информация по химии вкусоароматических веществ в основных пищевых компонентах приводится в соответствующих главах. Например, многие особенности вкусоароматических соединений, образующихся в результате реакций Майяра, рассмотрены в главах 3 и 14, а вкусоароматические вещества, образующиеся в результате свободнорадикального окисления липидов, — в главе 4. Данные по низкокалорийным подсластителям и по связыванию вкусоароматических веществ макромолекулами частично представлены в главах 3, 5 и 11.

* См. ГОСТ Р ИСО 5492–2005. — *Примеч. ред.*

10.1.2. Методы анализа вкусоароматических соединений

Как мы уже отмечали, химия вкусоароматических соединений зачастую сводилась к анализу летучих соединений с помощью газовой хроматографии с детектированием с помощью масс-спектрометрии быстрого сканирования [22, 65]. Эта точка зрения, однако, слишком ограничена, поскольку для исследования вкусоароматических соединений уже сформировался особый спектр методов. Здесь мы не будем подробно разбирать методы анализа вкусоароматических веществ, поскольку этой теме посвящено много других работ (см., например, [50, 67, 77]).

Анализ вкусоароматических веществ — дело весьма трудоемкое, поскольку они присутствуют в низких концентрациях (в мг, мкг и нг/кг или частях на миллион, миллиард и триллион соответственно), в составе многокомпонентных смесей (например, в кофе идентифицировано свыше 450 летучих соединений), а также из-за нестабильности некоторых ароматических соединений и их иногда очень высокой (высокое давление пара) или низкой (низкое давление пара) летучести. Для идентификации вкусоароматических соединений обычно требуется предварительное их выделение из многокомпонентного матрикса пищевых продуктов с одновременным концентрированием (например, перегонка), но этот процесс следует проводить с минимальным нарушением нативного состава (композиции), особенно при изучении качества аромата. Адсорбция ароматических соединений из равновесной паровой фазы над пищевыми продуктами на пористых полимерах с последующими либо термической десорбцией, либо элюированием растворителем дает возможность минимизировать разрушение чувствительных соединений при их выделении. Вместе с тем, для соединений с более высокой температурой кипения и некоторых соединений, присутствующих в очень низких концентрациях, могут потребоваться методы на основе перегонки для обеспечения их адекватного извлечения для анализа.

Хотя основной целью является качественная идентификация активных вкусоароматических соединений и их предшественников (прекурсоров), не менее важной задачей является точное определение концентраций этих соединений в пищевых продуктах. Особую ценность при попытках выявить корреляцию между присутствием тех или иных вкусоароматических соединений и возникающими в результате органолептическими ощущениями имеют количественные данные. Несмотря на накопление большого количества данных относительно вкусоароматических веществ, присутствующих в паровой фазе над продуктом в упаковке, или относительно полученных из пищевых продуктов различными способами изолятов, зачастую бывает довольно трудно на основании этих данных воспроизвести высококачественные копии аромата из-за недостающих компонентов или искаженных количественных значений.

Более того, попытки имитировать вкус и аромат в модифицированных пищевых продуктах (например, в рецептурах с пониженным содержанием жира) путем подбора вкусоароматических композиций, используемых в традиционных продуктах (например, с неизменным содержанием жира) не всегда приводили к успеху. Поскольку была высказана гипотеза, что причиной этих трудностей является различная скорость высвобождения в полости рта отдельных вкусоароматических соединений из модифицированного пищевого матрикса (например, с пониженным содержанием жира), измерению высвобождения вкусоароматических компонентов в ротовой полости в реальном времени были посвящены многие НИР с применением методов масс-спектрометрии с ионизацией при атмосферном давлении. Хотя эксперименты и подтверждают различия в интенсивности и скорости высвобождения отдельных соединений из пищевых продуктов в полости рта, измеренные различия относятся, главным образом, к интенсивности вкуса и аромата, и, по-видимому, не коррелируют с различиями в воспринимаемом качестве вкуса и аромата у немодифицированных и модифицированных пищевых матриксов. Из-за этого основное внимание исследователей сместилось к обнаружению в традиционных немодифицированных пищевых продуктах молекул, модифицирующих вкус и аромат, но удаляемых в процессе получения модифицированных пищевых продуктов или не включаемых в них.

Если в разработке и применении методов, которые сопоставляют объективные химические данные по вкусоароматическим веществам с субъективными органолептическими данными, достигнут определенный прогресс, то успехи стандартной оценки вкусоароматических веществ исключительно аналитическими методами довольно скромны. Разработка и промышленное внедрение устройств типа «электронный нос» [52] стали своего рода ответом на явную потребность в ускоренных способах достоверного измерения химических параметров интенсивности вкуса, аромата и качества пищевых продуктов. Несмотря на то

что имеются определенные сведения об успешном применении этих устройств, особенно при отбраковке продуктов по запаху порчи (например, по определенной степени развития окислительной прогорклости), до сих считается, что подобные приборы находятся еще на ранних стадиях разработки.

10.1.3. Органолептическая оценка ароматов

Независимо от конечных целей исследования аромата необходима органолептическая оценка вкусоароматических соединений и пищевых продуктов. В некоторых ситуациях требуется органолептическая характеристика образцов профессионально подготовленными дегустаторами или специалистами. При этом для определения вкусоароматических различий и получения достоверной описательной (дескриптивной) информации по вкусу и аромату, а также для определения вкусоароматических предпочтений потребителей во многих случаях необходимо использовать формальные дегустационные комиссии (панели) и методы статистического анализа. Опубликованы ряд обзоров и книг, посвященных формальному сенсорному анализу, содержащих детальную информацию по этому чрезвычайно важному аспекту оценки аромата [1, 2, 62,72].

Органолептические оценки используют для документирования качественных вкусоароматических характеристик химических веществ, при этом качественное и количественное восприятие вкуса или аромата отдельного химического вещества или сочетания веществ варьируют в зависимости от концентрации. Определение порога обнаружения ароматических веществ обеспечивает меру интенсивности аромата отдельных индивидуальных веществ. Эти пороги обнаружения определяются с использованием отдельных представителей общей популяции. Членам дегустационной комиссии предоставляется диапазон концентраций конкретного вкусоароматического соединения в заданной среде (вода, молоко, воздух и т. д.), и каждый дегустатор указывает, может или не может он обнаружить это соединение. Интервал концентраций, в котором не менее половины (а иногда больше) дегустаторов способны обнаружить данное соединение, называется вкусоароматическим порогом [21]. Соединения сильно отличаются по силе вкуса или запаха, и поэтому бывает так, что очень малое содержание вещества с низким порогом обнаружения оказывает значительно более сильное влияние на аромат продукта, чем соединение, присутствующее в достаточно больших количествах, но с высоким вкусоароматическим порогом.

Расчет ароматических единиц (АЕ, *OU, Odor Units*) заключается в делении значения концентрации данного ароматического соединения на значение его ароматического порога (то есть АЕ — это данная концентрация, деленная на пороговую), в результате чего получается оценка вклада конкретного вкусоароматического соединения. В настоящее время широко применяется анализ ароматических соединений на основе разбавления экстракта (*AEDA, Aroma Extract Dilutuion Analysis*) [27], заключающийся в идентификации наиболее сильных одорантов в пищевых продуктах и органолептическом обнаружении отдельных соединений в газ-хроматографических элюатах, получающихся в результате последовательных разведений ароматических экстрактов из пищевых продуктов. Такие методы дают количественную информацию об относительной интенсивности или силе ароматических соединений в пищевых продуктах и напитках, однако они зачастую не учитывают или значительно недооценивают качественные особенности ароматических свойства соединений. Это особенно заметно, если отдельные соединения обеспечивают распознавание, «характерность» или участвуют в создании характерного признака того или иного аромата. Такие методы определения наиболее сильных ароматических соединений подвергаются критике также потому, что они предоставляют те данные по силе аромата, которые определены при отсутствии влияния пищевого матрикса и промежуточных физиологических эффектов от восприятия смесевых вкусоароматических соединений. Таким образом, экстраполяция таких данных на реальные пищевые системы является весьма спорной.

10.1.4. Молекулярные механизмы восприятия вкуса и аромата

Несмотря на то что понимание молекулярной основы восприятия вкуса и аромата уже давно считается главной целью, имеющей много практических областей применения, лишь относительно недавно в этой сфере были сделаны научные открытия, начавшие замещать теоретические гипотезы установленными фактами и принципами. Большая часть недавнего прогресса в понимании восприятия вкуса и аромата была достигнута с помощью методов современных биомолекулярных исследований.

Движущей силой для проведения исследований механизмов ощущения вкуса и аромата является стремление в большей степени использовать структурные свойства молекул (например, для получения предсказуемого вкуса или аромата с помощью тех или иных структурных особенностей) в целях разработки более полезных и эффективных вкусоароматических соединений (в частности, интенсивных подсластителей, см. также главу 11). Аналогичным образом существует потребность в веществах, маскирующих или устраняющих неприятные побочные привкусы некоторых пищевых ингредиентов (например, производных соевых белков) и особенно нежелательную горечь, присущую некоторым лекарственным препаратам или нутрицевтикам (см. главу 12).

За почти неограниченные вариации восприятия интенсивности и качества запахов отвечают специализированные клетки обонятельного эпителия носовой полости, обладающие способностью обнаруживать следовые количества летучих пахучих веществ. Вкусовые сосочки, расположенные на языке и задней стенке ротовой полости, дают возможность людям ощущать сладкий, кислый и соленый вкусы, горечь и вкус «умами» (или «юмами»), причем эти ощущения являются компонентами флейвора пищевых продуктов. В целом общий процесс восприятия запаха и вкуса на молекулярном уровне включает в себя три последовательных стадии, которые в конечном счете обусловливают восприятие дегустатора. К этим стадиям относятся рецепция, трансдукция и нейронная обработка (кодирование информации в электрические импульсы). Подробнее эти биологические процессы описаны в работах [45,74].

Для пахучих и некоторых вкусовых веществ (сладких, горьких и умами) первичный акт восприятия включает в себя избирательное связывание (считается, что оно подчиняется концептуальной структурной модели «ключ-замок») молекулы вкусоароматического вещества со специфическим рецепторным белком в мембране соответствующей клетки рецептора. При связывании молекулы вкусоароматического вещества с этим рецепторным белком химическая энергия преобразуется в электрическую посредством того или иного специфического каскада биохимических реакций.

Начальное связывание рецепторного белка и вкусоароматической молекулы стимулирует конъюгированный *G*-белок к активации ферментативных реакций, приводящих к образованию специфических продуктов (например, циклического АМФ или инозиттрифосфата), взаимодействующих с Na^+- или Ca^{2+}-ионными каналами в мембране рецепторной клетки и открывающих их. Возникающий в результате поток заряженных ионов через мембрану рецепторной клетки вызывает ее деполяризацию и генерирует уникальные последовательности электрических испульсов (биоэлектрических потенциалов или нервных импульсов), которые соответствуют количеству стимулирующего клетку одоранта и дают некоторую информацию об идентичности вкусоароматической молекулы. Ключевые процессы, с помощью которых кодируется электрическая информация, на данный момент во многом теоретические, однако данные генетических и физиологических исследований подтверждают ту точку зрения, что они обеспечиваются генерированием в обонятельной луковице и других мозговых структурах своего рода «пространственных карт», различающихся долей работающих нейронов нейронной сети и их интенсивностью.

На молекулярном уровне события, участвующие в восприятии кислых (H^+) и соленых (Na^+) ионных вкусовых веществ отличаются от событий, происходящих при восприятии сладких, горьких и умами-одорантов и вкусовых веществ; кроме того, они отличаются и друг от друга. При этом и кислые, и соленые ионные вкусовые вещества непосредственно взаимодействуют с ионными каналами в мембранах клеток вкусовых рецепторов. Что касается кислых вкусовых веществ, то H^+-ионы связываются непосредственно с ионными каналами, вызывая их закрытие для потока ионов Na^+, что приводит затем к деполяризации мембраны и возникновению нейронного импульса. И наоборот, восприятие соленого вкуса начинается с непосредственного проникновения катионов Na^+ из внешнего окружения во вкусовые клетки рецепторов, так как ионные каналы проницаемы для катионов Na^+ Таким образом, после проникновения Na^+-катионов в рецепторные клетки и изменения трансмембранного потенциала эти клетки деполяризуются и в ответ на присутствие соли (NaCl) во внешнем окружении генерируют нейронный импульс.

Некоторые вкусоароматические молекулы обладают уникальными органолептическими свойствами (остротой, жгучестью, освежающим эффектом и эффектом покалывания), которые значительно обогащают букет пищевых продуктов и напитков. Поскольку эти ощущения являются результатом воздействия на определенные нервные волокна и в их генерации специфические рецепторные (например, вкусовые или обонятельные) клетки участия не принимают, то в прошлом их обычно называли неспецифическими вку-

сообразующими ощущениями. Такие ощущения в тканях ротовой и носовой полости появляются параллельно ощущениям, распознаваемых кожными хемосенсорными системами (раздражение, боль, тепло, холод и т. п.), однако для отличения этих связанных со вкусом ощущений, исходящих из иннервирующих систем ротовой и носовой полостей (то есть от систем тригеминального, языкоглоточного и блуждающего нервов) недавно был предложен термин «хеместезис» (*chemesthesis*)*.

Прочие неспецифические, химически индуцируемые и влияющие на вкус ощущения (полнота вкуса, комплексность и т. п.), вероятно, воспринимаются тригеминальной системой, но соединения, вызывающие эти эффекты, малоизвестны, а механизмы их восприятия до конца не ясны. В настоящее время об интригующем процессе вкусовосприятия постоянно появляются новые данные (см работы [51, 74]).

10.2. Вкусовые и вкусообразующие вещества

Довольно часто (хотя не всегда) вещества, отвечающие за вкусоароматическое восприятие, являются водорастворимыми и относительно нелетучими. Как правило, они также присутствуют в пищевых продуктах в более высоких концентрациях, чем ароматические вещества, и зачастую при исследовании вкусоароматических соединений к ним относились не слишком серьезно. Из-за огромной важности веществ, обусловливающих вкусовые ощущения, для потребительского признания пищевых продуктов, ниже мы рассмотрим их химические свойства, а также свойства веществ, ответственных за некоторые менее определенные вкусоароматические ощущения.

10.2.1. Сладкие вещества

Сладкие вещества оказались в центре внимания благодаря интересу к сахарозаменителям и стремлению найти подходящие заменители для некоторых низкокалорийных подсластителей, включая сахарин и цикламат (см. главу 11).

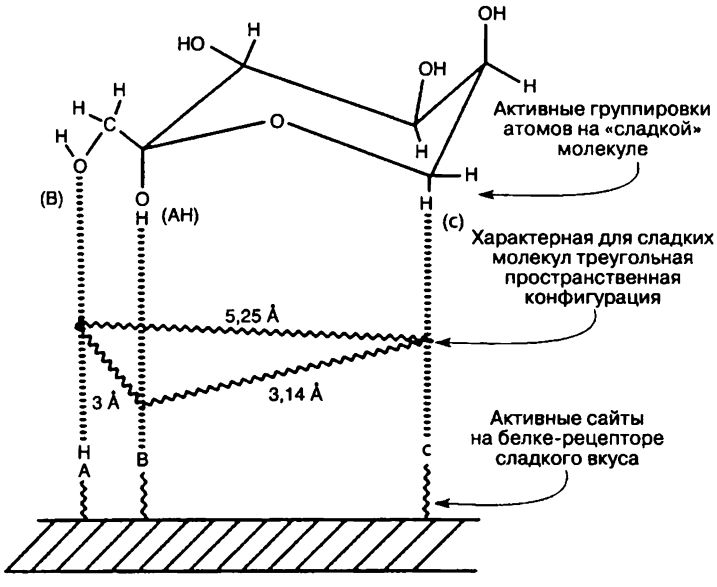


Рис. 10.1 Схематическое изображение связи между AH/B и γ-сайтами в той части молекулы, которая обеспечивает сладкий вкус β-*D*-фруктопиранозы

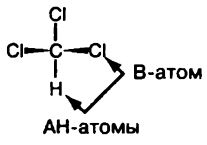
Прежде было популярно мнение, что сладкий вкус обусловлен гидроксильными (—OH) группами, поскольку их много в молекулах сахаров. Однако эта точка зрения справедливо подвергается критике, так как полигидроксильные соединения значительно варьируют по сладости, причем сладкими являются и многие аминокислоты, соли некоторых металлов и такие неродственные соединения, как хлороформ ($CHCl_3$) и сахарин (см. главу 11). Тем не менее, очевидно, что у сладких веществ имеются некоторые общие характерные особенности, и на протяжении последних 75 лет превалирует теория, связывающая сладкий вкус с молекулярной структурой, и удовлетворительно объясняющая, почему некоторые вещества проявляют сладость.

В работе [69] для вкусообразующих элементов, общих для всех соединений, которые вызывают ощущение сладости, была предложена теория AH/B** (рис. 10.1).

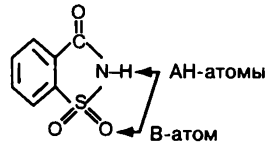
* Это касается ощущений, возникающих при активации химическими соединениями рецепторных механизмов, которые биологически предназначены для других ощущений — обычно тех, которые участвуют в создании болевых, тактильных и температурных ощущений в глазах, носе, во рту и в горле. — *Примеч. перев.*

** AH — донор водородной связи; B — основание Льюиса, то есть вещество, способное отдавать кислоте пару электронов с образованием ковалентной связи. — *Примеч. перев.*

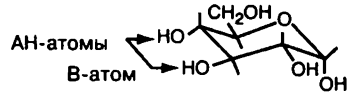
Вкусообразующим элементом исходно считалась комбинация ковалентно связанного водородной связью протона и электроотрицательной орбитали, расположенной на расстоянии около 3Å от протона. Таким образом, для обеспечения сладкого вкуса в молекуле должны присутствовать смежные (вицинальные) электроотрицательные атомы. Более того, один из этих атомов должен иметь связанный водородной связью протон. Эту роль в «сладких» молекулах зачастую выполняют атомы кислорода, азота и хлора, причем атомы кислорода гидроксильной группы могут выполнять в молекуле функцию либо АН, либо В. Ниже приведены простые АН/В-связи для хлороформа (I), сахарина (II) и глюкозы (III).



(I) Хлороформ



(II) Сахарин



(III) Глюкоза

Вместе с тем из рис. 10.1 видно, на АН/В-компоненты вкусообразующего элемента накладываются и стереохимические требования, то есть они присоединяются к сайту рецептора определенным образом. По современным представлениям взаимодействие между активными группами «сладкой» молекулы и вкусовым рецептором происходит путем водородного связывания АН/В-компонентов с подобными же структурами вкусового рецептора. Чтобы распространить эту теорию на интенсивные сладкие вещества, ее дополнили третьей характерной чертой, а именно липофильными областями «сладких» молекул, организованными специфическим стереохимическим образом (их обычно обозначают γ), которые притягиваются к аналогичным липофильным областям вкусового рецептора. Липофильные участки «сладких» молекул зачастую представляют собой метиленовые ($-CH_2-$), метиловые ($-CH_3$) или фениловые ($-C_6H_5$) группы. Завершенная, обеспечивающая сладкий вкус структура геометрически расположена так, что у высокоинтенсивных сладких веществ наблюдается трехсторонний контакт всех активных элементов (АН, В, γ) с рецепторной молекулой. Такая конфигурация дает логическое обоснование тройственной структурной теории сладкого вкуса.

Крайне важной особенностью интенсивных сладких веществ является наличие γ-сайта, но в сладости сахара он играет меньшую роль [8]. По-видимому, этот сайт облегчает доступ соответствующих молекул в сайт вкусового рецептора и тем самым влияет на ощущаемую интенсивность сладкого вкуса. Поскольку сахара преимущественно гидрофильны, эта особенность ограниченно проявляется только у некоторых сахаров типа фруктозы. Этот компонент элемента, обеспечивающего сладость, в значительной степени отвечает за вариации качества сладкого вкуса у различных сладких веществ, что важно не только в интенсивно-временном или временном аспектах восприятия сладости, но и имеет отношение к некоторым особенностям взаимодействия сладкого и горького вкусов у некоторых соединений.

В молекулах сахара структуры, обеспечивающие одновременно и сладость, и горечь, обладают определенными особенностями, позволяющими им взаимодействовать как с любым из двух этих рецепторов, так и с обоими типами рецепторов одновременно, создавая таким образом комбинированное вкусовое ощущение. Горькие свойства структуры подавляют сладкий вкус даже в том случае, если концентрация горечи в исследуемом растворе ниже, чем концентрация, необходимая для ее восприятия. Горечь сахарам, по-видимому, придается комбинацией нескольких эффектов, включая конфигурацию аномерного центра, наличие кислорода в составе цикла, группу первичных спиртов у гексоз и природу заместителей. Зачастую изменения в структуре и стереохимии «сладкой» молекулы приводят к утрате или подавлению сладости или к образованию горечи.

10.2.2. Горькие вещества

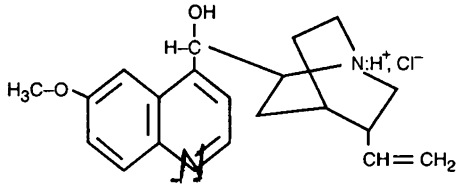
Ощущение горечи тесно связано с ощущением сладости из-за их молекулярной структурно-рецепторной взаимосвязи [59, 60]. Сходство горечи со сладостью обусловлено стереохимией молекул стимулирующего вещества, причем оба эти ощущения вызываются сходными особенностями молекул. Это является причиной того, что некоторые молекулы вызывают и горькое, и сладкое ощущение. Несмотря на то что «слад-

кие» молекулы должны содержать две полярные группы, которые могут быть дополнены неполярной группой, «горьким» молекулам, по-видимому, требуется только одна полярная и гидрофобная группы [9].

Некоторые ученые [5, 7, 14] считают, что большинство горьких веществ обладает AH/B-организацией, идентичной «сладким» молекулам, а также гидрофобной группой. Согласно этой концепции ориентация AH/B-элементов на сайтах специфических рецепторов, расположенных на плоском дне их полостей, обеспечивает различение сладости и горечи у молекул с необходимыми молекулярными особенностями. Молекулы на сайтах, ориентированных на горькие соединения, дают эффект горечи, а молекулы, соответствующие ориентации на сладкий вкус, вызывают ощущение сладости. Если же геометрия молекулы такова, что она может ориентироваться в любом направлении, то проявляется горько-сладкое ощущение.

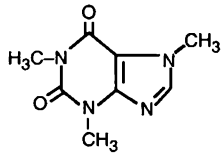
Такая модель выглядит особенно привлекательной для аминокислот, *D*-изомеры которых сладкие, а *L*-изомеры — горькие [43]. Поскольку гидрофобный (или γ-сайт) сладкого рецептора является ненаправленно липофильным, он может давать как сладкий, так и горький эффекты. Факторы молекулярного объема обеспечивают стереохимическую селективность в отношении рецепторных сайтов, расположенных в каждой рецепторной полости. Из вышесказанного следует вывод, что существует обширная структурная база для модификации горького вкуса, причем большинство эмпирических наблюдений связи горечи и молекулярной структуры вполне объясняются современными теориями.

В качестве стандарта восприятия горького вкуса обычно принимают хинин. Порог обнаружения гидрохлорида хинина (формула IV) составляет около 10 мг/кг. Как правило, горькие вещества характеризуются более низким порогом вкусовосприятия, чем другие вкусовые вещества; кроме того они также имеют тенденцию к меньшей растворимости в воде по сравнению с другими вкусовыми ингредиентами. Хинин разрешен к применению в качестве добавки в безалкогольные напитки, обладающие также кисло-сладкими свойствами. Горечь хорошо гармонирует с другими вкусовыми ощущениями и придает напиткам освежающий эффект, стимулирующий вкусовые рецепторы. Практика добавления хинина в безалкогольные напитки, вероятно, ведет свое начало от стремления подавить или замаскировать горечь хинина как лекарства от малярии.

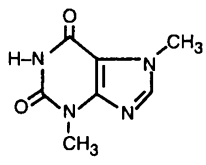


(IV) Гидрохлорид хинина

Помимо безалкогольных напитков горечь является важным атрибутом некоторых других часто употребляемых напитков, в том числе кофе, какао и чая. Кофеин (V) является умеренно горьким при его содержании в воде 150–200 мг/л; он также присутствует в кофе, чае и орехах колы. Теобромин (VI) очень похож на кофеин и присутствует в основном в какао, способствуя его горькому вкусу. Кофеин добавляют к безалкогольным напиткам на основе колы в концентрации до 200 мг/л, причем большую часть используемого для этой цели кофеина получают из экстрактов зеленых кофейных бобов при изготовлении декофеинированного кофе.



(V) Кофеин



(VI) Теобромин

Для придания пиву уникального вкуса и аромата в пивоваренной промышленности используют большие количества хмеля. Очень важным аспектом букета хмеля является горечь, которая вносится некоторыми соединениями-производными изопреноидов. Эти нелетучие горькие вещества рассматриваются как производные гумулона или лупулона, известных в пивоваренной промышленности как α- или β-хмелевые

кислоты соответственно. Наиболее широко распространенным веществом является гумулон, который при кипячении сусла превращается в изогумулон в ходе реакции изомеризации (рис. 10.2) [16].

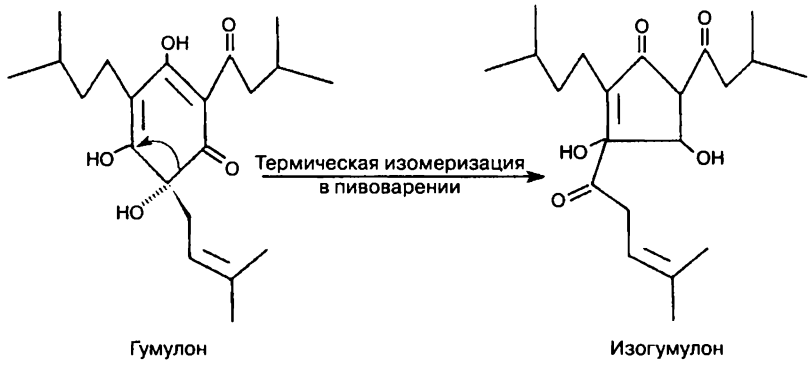
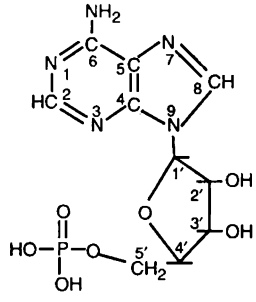


Рис. 10.2. Термическая изомеризация гумулона до изогумулона в ходе кипячения сусла

Изогумулон — это предшественник соединения, обусловливающего так называемый «солнечный» или меркаптановый привкусы пива, подвергаемого действию прямого солнечного света. В присутствии сероводорода, образующегося в ходе дрожжевого брожения, происходит фотокатализируемая реакция в позиции атома углерода, соседствующего в изогексениловой цепи с кетогруппой, с образованием 3-метил-2-бутен-1-тиола (пренилмеркаптана), обусловливающего меркаптановый «запах скунса». Избирательное восстановление кетона в предварительно изомеризованных хмелевых экстрактах предотвращает эту реакцию, что позволяет расфасовывать пиво в прозрачную стеклянную посуду без риска развития этого меркаптанового привкуса. Долгое время вопрос о том, сохраняются ли ароматические соединения хмеля после кипячения сусла, был дискуссионным, однако в настоящее время появились убедительные доказательства, что эти важные соединения действительно «выживают» в процессе кипячения сусла, и из горьких веществ хмеля образуются другие вещества, участвующие в создании хмелевого аромата пива.

Хотя во многих пищевых продуктах и напитках горький вкус желателен, в некоторых продуктах и напитках, включая новейшие нутрицевтики и лекарственные средства, нежелательная горечь часто представляет проблему. Несмотря на то что на идентификацию веществ, способных маскировать горечь, затрачены большие усилия, до сих пор они привели лишь к частичному успеху. Хотя некоторые смолы или полимеры, повышающие вязкость, способны подавлять горечь, их использование обычно смягчает эту проблему лишь частично. Относительно недавно было обнаружено, что сильными свойствами блокировки горечи обладает аденозин-5'-монофосфат (АМФ), образующийся в ходе промежуточного энергетического метаболизма, применение и его для подавления горечи кажется довольно многообещающим.



(VII) Аденозин-5'-моносфат (АМФ, сильный блокиратор горечи)

Развитие чрезмерной горечи является также одной из основных проблем в переработке цитрусовых. У грейпфрута некоторая степень горечи желательна и ожидаема, но зачастую интенсивность горечи свежих и переработанных фруктов превышает степень горечи, предпочитаемой потребителями. В цитрусовых содержатся определенные флавановоновые гликозиды, причем преобладающим флаваноном в грейпфруте и горьком апельсине (*Citrus auranticum*) является нарингин. Соки с высокими содержанием нарингина очень горькие, из-за чего их выпуск экономически неэффективен (за исключением случаев, когда их мож-

но разводить соками с низким уровнем горечи). Горечь нарингина обусловлена конфигурацией молекулы, образующейся в результате связи рамнозы и глюкозы в позиции 1–2. Из промышленно выпускаемых препаратов пектина цитрусовых и из *Aspergillus spp.* была выделена нарингиназа — фермент, который гидролизует эту 1–2-связь (рис. 10.3) с образованием негорьких веществ. Для снижения горечи грейпфрутового сока с чрезмерным содержанием нарингина разработаны также системы с иммобилизованным ферментом. Кроме того, нарингин промышленно выделяют из кожуры грейпфрута и используют вместо кофеина для придания горечи некоторым пищевым продуктам.

Основным компонентом горечи апельсинов сорта навель и валенсийского апельсина является тритерпеноид дилактон (с *A*- и *D*-кольцами), называемый лимонином, который также встречается в грейпфруте как активное горькое вещество. Этот лимонин в неповрежденных фруктах отсутствует — преобладающей его формой являются не имеющие вкуса производные лимонина, образующиеся при ферментативном гидролизе *D*-лактонного кольца лимонина (рис.10.4). После отжима сока кислые условия благоприятствуют замыканию *D*-кольца с образованием лимонина, в результате чего возникает эффект «запаздывающей горечи», что связано с серьезными экономическими последствиями.

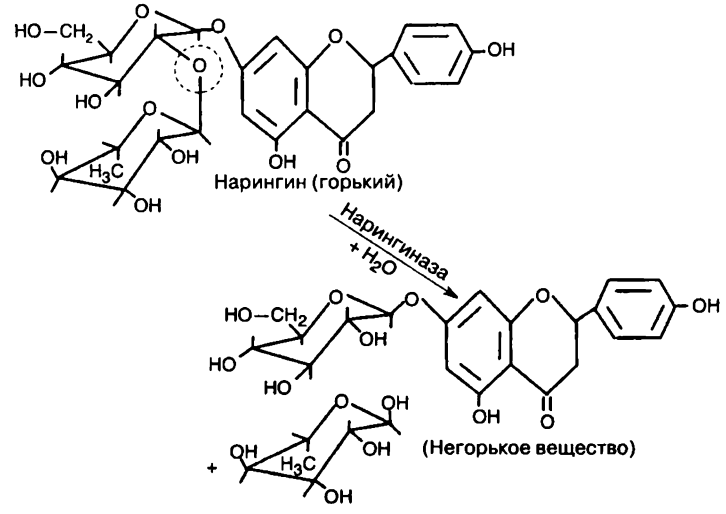


Рис. 10.3. Реакция ферментативного гидролиза нарингина нарингеназой в целях снижения горечи продуктов на основе цитрусовых

Были разработаны методы снижения горечи апельсинового сока с использованием иммобилизованных ферментов, продуцируемых микроорганизмами *Arthrobacter sp.* и *Acinetobacter sp.* [34]. Ферменты, которые лишь просто размыкают *D*-кольцо лактона, дают только временное решение проблемы, так как в кислых условиях кольцо снова замыкается. Вместе с тем использование лимоноат-дегидрогеназы, превращающей разомкнутое *D*-кольцо в негорький 17-дегидролимоноат с *A*-лактонным кольцом (см. рис.10.4) дает необратимый способ снижения горечи апельсинового сока. Другие способы снижения горечи цитрусовых соков включают использование полимерных адсорбентов, предпочитаемых в настоящее время соковой промышленностью [40].

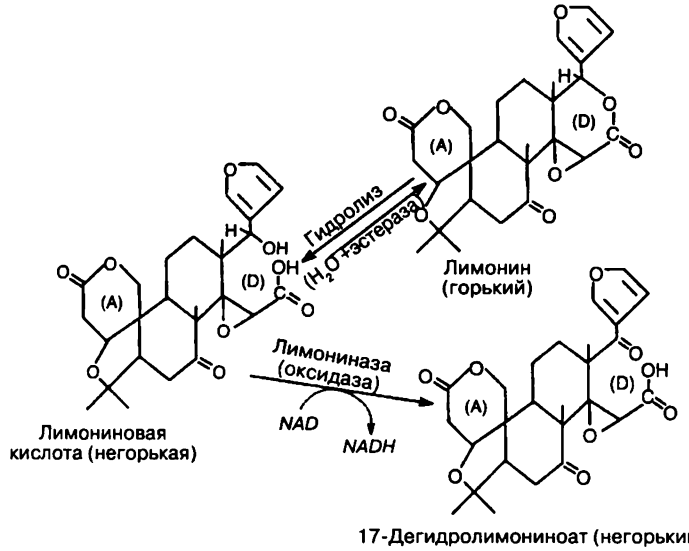


Рис. 10.4. Равновесная реакция, приводящая к образованию лимонина и ферментативному снижению горечи в цитрусовых соках

Выраженная нежелательная горечь часто встречается у белковых гидролизатов и зрелых сыров. Она обусловлена суммарной гидрофобностью аминокислотных боковых цепей в пептидах. У всех пептидов имеется соответствующее количество полярных групп АН-типа, входящих в полярные сайты рецепторов, но поскольку отдельные пептиды существенно различаются по размеру и природе их гидрофобных групп, то различается и способность этих гидрофобных групп взаимодействовать с нужными гидрофобными сайтами рецепторов го-

речи. В работе [59] было показано, что горечь пептидов можно прогнозировать путем расчета среднего значения гидрофобности, обозначаемого Q.

Способность белка вступать в гидрофобные ассоциации зависит от суммарного влияния отдельных гидрофобных неполярных боковых цепей аминокислот. Эти взаимодействия вносят основной вклад в свободную энергию, связанную с развертыванием молекулы белка. Суммируя значения ΔG для отдельных боковых цепей аминокислот пептида, можно рассчитать среднюю гидрофобность Q (уравнение 10.1):

$$Q = \frac{\sum \Delta G}{n}, \tag{10.1}$$

где n — количество аминокислотных остатков.

Отдельные значения ΔG для аминокислот определяют по растворимости [76] (табл. 10.1). Значения Q выше 5855 кДж/моль (1400 ккал/моль) свидетельствуют, что пептид будет горьким, а менее 5436 кДж/моль (1300 ккал/моль) гарантируют отсутствие горечи. На способность пептида вызывать горечь влияет также молекулярная масса пептида — потенциально горькими могут быть только пептиды с молекулярной массой менее 6000. Более крупные пептиды, по всей вероятности, не могут проникнуть в сайты рецепторов из-за своего объема (см. главу 5).

Таблица 10.1

Расчетные значения ΔG для отдельных аминокислот. По [59]

Аминокислота	Значение ΔG[a], кДж/моль	Аминокислота	Значение ΔG[a], кДж/моль
Глицин	0(0)	Лизин	6272,4 (1500)
Серин	167,3 (40)	Валин	7066,9 (1690)
Треонин	1839,9 (440)	Лейцин	10119,5 (2420)
Гистидин	2090,8 (500)	Пролин	10955,8 (2620)
Аспарагиновая кислота	2258,1 (540)	Фенилаланин	11081,2(2650)
Глутаминовая кислота	2299,9 (550)	Тирозин	12001,2(2870)
Аргинин	3052,6 (730)	Изолейцин	12419,4 (2970)
Аланин	3052,6 (730)	Триптофан	12544,8 (3000)
Метионин	5436,1 (1300)		

[a] В скобках приведены значения ΔG в ккал/моль (1 ккал = 4,1816 кДж). Значения ΔG отражают изменение свободной энергии переноса боковых цепей аминокислоты из этанола в воду и несколько отличаются от значений, получаемых в результате переноса аминокислотных боковых цепей из октанола в воду (см. табл. 5.3 в главе 5).

Пептид, структурная формула которого приведена на рис.10.5, получается в результате протеолиза α_{s1}-казеина по связям 144–145 и 150–151 [59], и его расчетное значение Q составляет 9576 кДж/моль (2290 ккал/моль). Данный пептид очень горький и может служить примером высоко гидрофобных пептидов, легко получаемых из α_{s1}-казеина. Именно такие пептиды обусловливают горечь зрелых сыров.

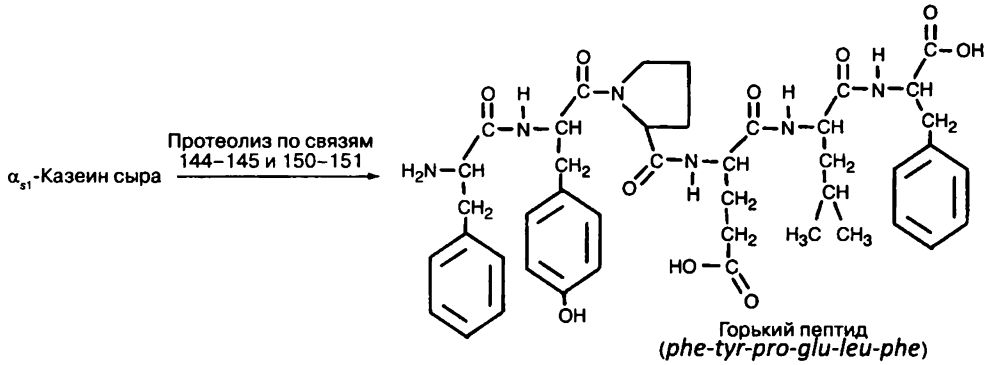
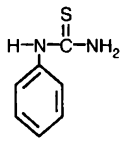


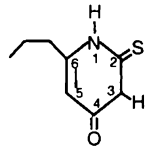
Рис. 10.5. Реакция гидролиза α_{s1}-казеина с образованием горького пептида (*phe-tyr-pro-glu-leu-phe*) с сильными суммарными неполярными свойствами

У людей из-за генетических различий способность ощущать горечь бывает разной. Конкретный человек воспринимает определенное вещество в заданной концентрации как горькое, горько-сладкое или вообще безвкусное. Некоторыми людьми сахарин воспринимается чисто сладким, другие могут ощущать его легкую горечь, а некоторые считает его явно горьким и одновременно сладким. Заметный разброс в ощущении горечи отдельными людьми проявляется и в отношении многих других соединений, и зачастую горький вкус вообще не ощущается.

Одним из наиболее известных горьких соединений является фенилтиокарбамид (*PTC*) [1], и в начале 1930-х гг. было показано [4], что у него вкус горечи не ощущается примерно 40% белого населения США, а остальные 60% его ощущают. Поскольку способность к ощущению горечи *PTC* была очевидно генетически обусловленной, это соединение стали использовать в качестве маркера при изучении поведенческих и метаболических различий между теми людьми, кто ощущает горький вкус, и теми, кто его не ощущает. Поскольку для *PTC* характерен также сернистый запах, то для продолжения исследований ученые предпочитают использовать 6-*н*-пропил-2-тиоурацил (*PROP*), не имеющий запаха [63]. У этих двух веществ их горький вкус обусловливает именно группировка N–C=S.



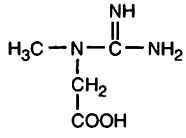
(VIII) фенилтиокарбамид (*PTC*)



(IX) 6-*н*-пропил-2-тиоурацил (*PROP или PRU*)

В настоящее время известно, что те люди, которые воспринимают *PROP* интенсивно горьким, генетически обладают способностью обостренно ощущать самые разные привкусы и признаны своего рода «супердегустаторами». В настоящее время ведутся исследования многих физиологических и психологических аспектов *PROP*-чувствительных и *PROP*-нечувствительных людей в стремлении обнаружить основополагающие факторы предпочтений в еде и пищевых продуктах, а также определенные патологические состояния и факторы риска для населения в целом.

Если *PTC* и *PROP* — соединения относительно новые и не встречаются в пищевых продуктах, то креатин, также характеризующийся различным восприятием его горечи населением, входит в состав мясных продуктов. Креатин может присутствовать в нежирном мясе в концентрациях порядка мг/г [1], и этого достаточно для того, чтобы вкус некоторых супов некоторым людям казался горьким.



(X) Креатин

Горечь характерна и для солей, и это органолептическое свойство препятствует замене катионов натрия на другие катионы в пищевых продуктах, модифицируемых в целях снижения потребления натрия определенными группами населения. Атомно-молекулярные характеристики солей, обусловливающие горечь, судя по всему, отличны от свойств, вызывающих горечь органических соединений. Горечь солей, по-видимому, связана с суммой ионных диаметров анионов и катионов в составе данной соли [5, 6]. Соли с ионными диаметрами менее 6,5 Å обладают только соленым вкусом (например, LiCl — 4,98 Å; NaCl — 5,56Å; KCl — 6,28 Å), хотя некоторые испытуемые уже ощущают слабую горечь KCl. При увеличении диаметров ионов (CsCl — 6,96 Å; CsI — 7,74 Å) горечь солей возрастает, то есть хлорид магния (8,50 Å) имеет абсолютно горький вкус.

10.2.3. Соленые вещества

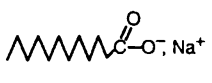
Классический чистый соленый вкус дают хлорид натрия (NaCl) и хлорид лития (LiCl), но последний не применяется в пищевых продуктах из-за его токсичности. В целом соли обладают сложным вкусом, который обычно описывается, как физиологическое смешение классических сладкого, горького, кислого

и соленого вкусов. Вместе с тем вкус солей часто выходит за пределы традиционных вкусовых ощущений [66] и их довольно трудно описать в классических вкусовых терминах. В некоторых случаях ощущения, вызываемые солями, более точно описываются другими, «неточными» терминами типа «химический» или «мыльный».

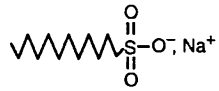
Вкусовые эффекты NaCl, по-видимому, выходят далеко за пределы классических вкусовых ощущений, и при пищевом применении NaCl обладает особыми свойствами, усиливающими вкус. Этот эффект легко продемонстрировать путем существенного сокращения или полного исключения NaCl из стандартных рецептур (например, в хлебобулочных изделиях).

Показано, что катионы придают базовый соленый вкус, а анионы его модифицируют [3]. Катионы натрия и лития дают только соленый вкус, а калий и другие катионы щелочноземельных металлов дают сочетание соленого и горького вкусов. Анионы модифицируют соленый вкус путем подавления вкуса, задаваемого катионами, и часто привносят свой собственный вкус. Среди типичных для пищевых продуктов анионов наименее подавляет соленый вкус анион хлора, а анион цитрата его подавляет сильнее, чем ортофосфорный анион. Кроме того, анион хлорида на вкус не влияет, а анион цитрата влияет на него меньше, чем ортофосфорный.

Вкусовые эффекты анионов влияют на вкус многих продуктов, в том числе плавленого сыра, в котором анионы цитрата и фосфата, содержащиеся в эмульгирующих солях (см. главу 11), подавляют соленость, привносимую ионами натрия, и добавляют анионные вкусовые свойства. Тем самым «мыльный» вкус, обусловленный натриевыми солями высокомолекулярных жирных кислот, моющими средствами или высокомолекулярными сульфатами, является следствием специфического действия анионов, которые могут полностью маскировать вкус, обусловленный катионами.



(XI) Лаурат натрия



(XII) Лаурилсульфат натрия

Государственные меры по поощрению снижения потребления натрия стимулировали интерес к пищевым продуктам, в которых соли натрия замещены другими веществами, содержащими, в частности, ионы калия и аммония. Поскольку у пищевых продуктов с этими веществами другой, обычно менее желаемый вкус, чем у продуктов с NaCl, для лучшего понимания основополагающих механизмов образования соленого вкуса и разработки заместителей соли ведутся постоянные исследования в надежде, что можно будет разработать продукты с нормальным соленым вкусом и с пониженным содержанием натрия.

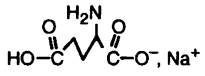
10.2.4. Кислые вещества

Вещества, придающие кислый вкус, по своему характеру являются кислотными и содержат по крайней мере один протон, способный к диссоциации в водных системах. Хотя на молекулярном уровне при восприятии кислотного, кислого или едкого вкусов начальное событие касается связывания протонов (H^+) с ионными каналами клеточных мембран рецепторов, что приводит к их закрытию для прохождения ионов Na^+ и деполяризации, качественные аспекты вкусовой реакции на кислое вещество изучены еще недостаточно. Вопреки широко распространенному убеждению концентрация кислоты в растворе, по-видимому, не является определяющим фактором в восприятии кислого вкуса. Судя по всему, первостепенное значение имеют другие, не до конца изученные молекулярные свойства (например, молекулярная масса, размер молекул и суммарная полярность). Таким образом, выбор кислот для пищевого применения зачастую определяется предшествующим опытом.

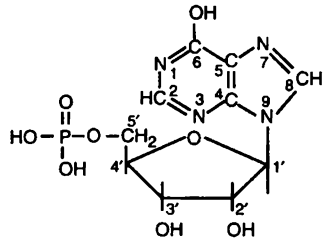
10.2.5. Вещества со вкусом умами

Соединения, вызывающие вкусовое ощущение умами (или юмами, *umami*) [39], применяют для улучшения вкуса при тепловой обработке пищевых продуктов и кулинарной обработке. Долгие годы вкусовые соединения со вкусом умами, а именно, *L*-моноглутамат натрия (*MSG*) и 5′-рибонуклеотиды (инозин-5′-монофосфат или 5′-*IMP*, а также гуанозин-5′-монофосфат) относили к веществам с неспецифическими вкусовыми реакциями (специфические вкусовые реакции для этих веществ пока не выявлены). После

обнаружения вкусовых рецепторов для этих соединений вкус умами теперь общепризнан как базовая вкусовая реакция [43].



(XIII) *L*-моноглутамат натрия (*MSG*)



(XVI) Инозин-5'-монофосфат (*IMP*)

При использовании веществ со вкусом умами в концентрациях выше индивидуальных порогов обнаружения они придают пище приятный вкус, вызывающий аппетит, а в концентрациях ниже индивидуальных порогов обнаружения они модифицируют и усиливают вкус. Такие соединения применяют для придания вкуса овощам, мясным продуктам, птице, рыбе, моллюскам и зрелым сырам.

У *D*-глутамата и 2'- и 3'-рибонуклеотидов отсутствует активность относительно усиления вкуса. Мощными усилителями вкуса являются некоторые синтетические производные 5'-рибонуклеотидов [44]. Как правило, у этих производных заместители расположены на пуриновой части молекулы в позиции 2. Между *MSG* и 5'-рибонуклеотидами наблюдается синергизм — как при создании вкуса умами, так и при усилении вкусовых ощущений, благодаря чему смеси этих веществ нашли широкое применение в пищевой промышленности. Существуют данные о том, что способность соединений со вкусом умами усиливать вкус частично является результатом их совместного занятия рецепторных сайтов, участвующих в восприятии сладкого, кислого, соленого и горького вкусовых ощущений.

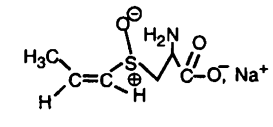
Несмотря на то что промышленно в качестве усилителей вкуса применяются только *MSG*, 5'-*IMP* и 5'-гуанозинмонофосфат, потенциальными кандидатами на промышленное использование являются 5'-ксантинмонофосфат и некоторые природные аминокислоты, в том числе *L*-иботеновая и *L*-трихоломовая [89]. Роль гидролизатов дрожжей в формировании вкуса пищевых продуктов частично обусловлена присутствием 5'-рибонуклеотидов. Многие очищенные усилители вкуса, используемые в пищевой промышленности, имеют микробное происхождение, в том числе фосфорилированные (*in vitro*) нуклеозиды, получаемые из РНК [44]. Общие сведения по вопросам усиления вкуса и аромата приведены в работах [44, 89].

10.2.6. Вещества со вкусом кокуми и прочие модификаторы вкуса

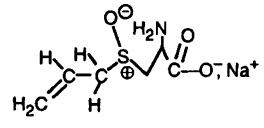
Как мы уже отмечали в разделе 10.2.3, обычная соль (NaCl) обладает сильными свойствами усиления и модификации вкуса многих пищевых вкусоароматических веществ. Хотя соль специфически воспринимается специализированными вкусовыми рецепторами (см. раздел 10.1.2), многие ученые считают, что она способна также усиливать вкус путем модификации функций других рецепторных клеток, воспринимающих базовые вкусы, или путем формирования других ощущений, исходящих от других невральных систем (в том числе тригеминальной) в ротовой полости. Таким образом, соль обладает некоторыми свойствами, аналогичными свойствам других веществ-усилителей вкуса, общие функции которых относительно его модификации еще не полностью изучены.

В Японии для обозначения некоторых подобных веществ, которые не вызывают отклика в отношении четырех базовых вкусовых ощущений или умами, но повышают вкусовую привлекательность и придающих вкусу пищи то, что зачастую описывается терминами «полнота вкуса», «комплексность вкуса», «плотность вкуса» и «тело», введен даже отдельный термин — «кокуми» [81]. Например, основными предшественниками летучих ароматических соединений, присущих чесноку и некоторым сортам репчатого лука, являются S-замещенные аминокислоты цистеин-сульфоксида (рис. 10.6), которые легко растворяются в воде и проявляют сильные свойства кокуми, что обусловливает вкусовую привлекательность [81, 82]. Таким образом, хотя вкус пищевых продуктов с чесноком (например, соусы для макаронных изделий, мясные соте и т. п.) может не иметь легко различимых вкусовых нот чеснока, вкус таких продуктов благодаря присутствию S-(2-пропенил)-*L*-цистеин сульфоксида ощущается как комплексный, полный и вызывающий аппетит.

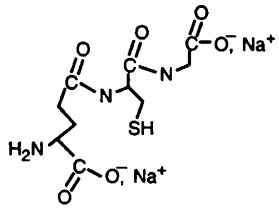
Легко растворимые в воде вещества, дающие вкус кокуми, немногочисленны, однако кокуми-активным является и еще один пептид, содержащий цистеин, а именно глутатион (его формула также приведена на рис. 10.6) [83]. В отклике на него янтарная кислота (и ее растворимые соли, в частности сукцинат натрия, см. рис. 10.6) помимо кислого вкуса обеспечивает и бульоноподобные вкусовые свойства. Хотя вкус янтарной кислоты пока что к кокуми не относят, ее используют в промышленности для придания бульоноподобной комплексности вкуса острым вкусоароматическим веществам (особенно в мясных соусах).



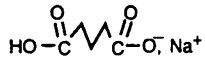
S-(1-пропенил)-*L*-цистеин сульфоксид (в репчатом луке, кокуми)



S-(2-пропенил)-*L*-цистеин сульфоксид (в чесноке, кокуми)



Глутатион (γ-*glu-цис-gly*); кокуми



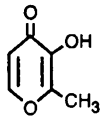
Сукцинат натрия (бульоноподобная комплексность)

Рис. 10.6. Структуры некоторых легко растворимых в воде соединений, модифицирующих вкус

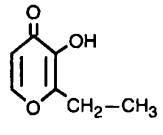
Для описания множества вкусовых оттенков, родственных вкусу кокуми, используют различные дескриптивные термины — «бархатистость», «полнота вкуса», «сливочность», «сочность» и др. Способностью модифицировать вкус обладают многие натуральные и синтетические вещества (рис. 10.7), причем часть этих веществ имеет некоторое структурное сходство. Например, одними из наиболее распространенных вкусоароматических добавок являются ароматизаторы ванилинового типа, так как большинством людей ароматы ванилина и этилванилина воспринимаются желательными. Вместе с тем помимо своего участия в формировании аромата родственные ванилину вещества обеспечивают также модификацию вкуса, что отражается в ощущении повышенной однородности, полноты и сливочности, особенно у сладких жиросодержащих продуктов типа мороженого.

В промышленности в качестве усилителей вкуса кондитерских изделий и фруктосодержащих продуктов широко применяются мальтол и этилмальтол (см. рис. 10.7). В высоких концентрациях оба этих вещества обладают приятным ароматом жженого сахара («жженки»), а в относительно низких концентрациях, при которых карамельные ноты не различимы (около 50 мг/кг), они популярны на рынке из-за вызываемого ими гладкого бархатистого ощущения, придаваемого кондитерским изделиям, фруктовым сокам и другим пищевым продуктам. Этилмальтол в качестве усилителя сладости более эффективен, чем мальтол, хотя последний снижает порог обнаружения сахарозы в два раза.

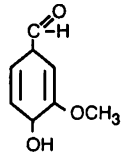
Относительно недавно было показано, что некоторые алкилфенолы, встречающиеся в природе в молоке и мясе жвачных животных, даже в очень низких концентрациях (нг/г) способствуют формированию в полости рта ощущений обволакивания, полновкусия и сочности. У этой группы соединений наиболее важные для модификации вкуса эффекты обеспечиваются мета-алкилзамещением на ароматическом кольце, причем основными соединениями этой группы, встречающимися в продуктах и ингредиентах от крупного рогатого скота, являются мета-крезол и мета-(*n*)-пропилфенол (см. рис. 10.7) [32].



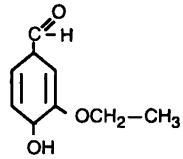
Мальтол (3-гидрокси-2-метил-4Н-пиран-4-он, палатон, пралинол)



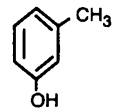
Этилмальтол



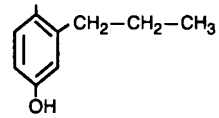
Ванилин



Этилванилин



мета-Крезол



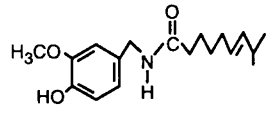
мета-(*n*)-Пропилфенол

Рис. 10.7. Структуры некоторых модифицирующих вкус соединений, ограниченно растворимых в воде

10.2.7. Жгучие вещества

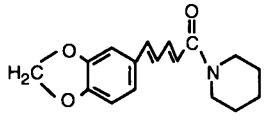
Жгучесть — это химическое свойство, характерное для целого ряда соединений, встречающихся в специях и овощах и вызывающее характерные ощущения жжения, остроты и жгучести [15]. Некоторые жгучие соединения, например, характерные для перца чили, черного перца и имбиря, нелетучи и оказывают свое действие в основном на ткани полости рта (за исключением аэрозолей, распыляемых в воздухе). В других специях и овощах присутствуют летучие (и, соответственно, с характерным ароматом) жгучие соединения, вызывающие ощущение жжения в ротовой и носовой полостях. К таким продуктам относятся горчица, хрен, редька, кресс-салат, некоторые сорта репчатого лука и гвоздика, в которой содержится активный эвгенол. Все эти острые специи и овощи используют в пищевых продуктах для придания им характерного вкуса или повышения аппетитности. Использование этих пряностей в переработанных пищевых продуктах в низких концентрациях часто «оживляет» вкус путем едва ощутимых нот, дополняющих уже имеющийся вкус. В этом разделе мы рассмотрим лишь три основных пряности — перец чили, имбирь и черный перец. Другие пряности мы затронем далее при рассмотрении вкусовых соединений растительного происхождения (изотиоцианатов, тиопропанол-S-оксида и эвгенола). Общий обзор свойств жгучих соединений приведен в работе [24].

В перце чили (*Capsicum sp.*) содержится группа веществ, называемых капсаициноидами, которые представляют собой ванилиламиды монокарбоновых кислот с разной длиной цепи (C_8–C_{11}) и ненасыщенными связями. Представителем этих жгучих соединений может служить капсаицин. В качестве заменителей натуральных экстрактивных веществ перца чили или маслосмол синтезируются капсаициноиды с компонентами насыщенных кислот с неразветвленной цепью. Общее содержание капсаициноидов у представителей широко распространенного рода *Capsicum sp.* варьирует в широких пределах [24] — например, в красном перце их 0,06%, в кайенском перце — 0,2%, в индийском перце саннам (*Sannam*) — 0,3%, а в угандийском перце — 0,85%. В сладком перце жгучие соединения присутствуют в очень малых концентрациях — его используют главным образом из-за окрашивающего действия и тонкого вкуса, частично формирующегося в результате окисления каротиноидов. В перце чили содержится также ряд летучих ароматических соединений, формирующих общий вкус и аромат приправленных им пищевых продуктов.



(XV) Капсаицин

Черный и белый перец получают из плодов растения *Piper nigrum*. Они отличаются лишь тем, что черный перец получают из незрелых зеленых плодов, а белый перец — из более зрелых плодов, которые обычно собирают в момент изменения их цвета с зеленого на желтый, но до покраснения. Основным жгучим соединением перца является амид пиперин. Для сильной жгучести необходима *транс*-геометрия алкенильных двойных связей, а утрата жгучести под действием света при хранении обусловлена, главным образом, изомеризацией этих двойных связей в *цис*-формы [24]. В перце также содержатся летучие соединения, в том числе *L*-формилпиперидин и пиперонал (гелиотропин), участвующие в формировании вкуса пищи, приправленной перцем или маслосмолами. Для ароматизации пищевых продуктов используют также синтетический пиперин.



(XVI) Пиперин

Имбирь — это специя, которую получают из корневищ клубневого многолетнего растения *Zingiber officinale Roscoe*. В нем содержатся жгучие соединения, а также некоторые летучие ароматические компоненты. Жгучесть свежего имбиря обусловлена группой фенилалкилкетонов, называемых гингеролами (наиболее активным из них является [6]-гингерол, рис. 10.8). Гингеролы различаются по длине

цепи (C_5–C_9), внешней по отношению к гидроксилзамещенному атому углерода. В ходе сушки и хранения гингеролы обычно дегидратируются с образованием двойной связи, конъюгированной с кетоновой группой. Эта реакция приводит к образованию группы соединений, называемых шогаолами, жгучесть которых даже больше, чем у гингерола. Действие на [6]-гингерол высоких температур может вести к расщеплению алкильной цепи за кетоновой группой с образованием метилкетона, для которого характерна легкая жгучесть.

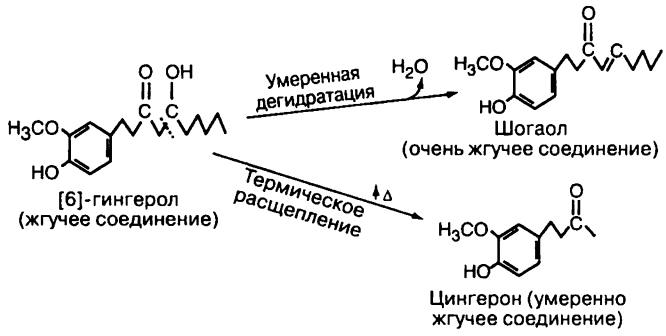
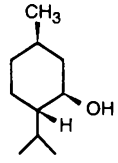


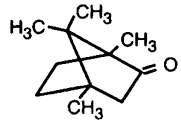
Рис. 10.8. Реакции превращения гингерола, влияющие на относительную жгучесть имбиря

10.2.8. Вещества освежающего действия

Освежающее ощущение — это химически обусловленое ощущение, возникающее при контакте определенных химических веществ с тканями носовой или ротоваой полости и стимулирующие невральные системы (например, тригеминальную и др.) [85]. Освежающий эффект, вызываемый веществами натурального происхождения, в большинстве случаев ассоциируется со вкусоароматическими веществами, подобными мяте, в том числе с мятой перечной, мятой колосистой и грушанкой (*Gaultheria procumbens*). Это ощущение вызывается нескольким соединениями, но в ароматизаторах чаще применяют (–)-ментол в форме его природного *L*-изомера. Известны несколько синтетических освежающих соединений. И натуральные, и синтетические соединения обычно дают сопутствующий запах камфоры, которая иногда служит модельным соединением для камфорной группы, так как помимо освежающего эффекта она обладает характерным запахом.



(XVII) (–)-Ментол



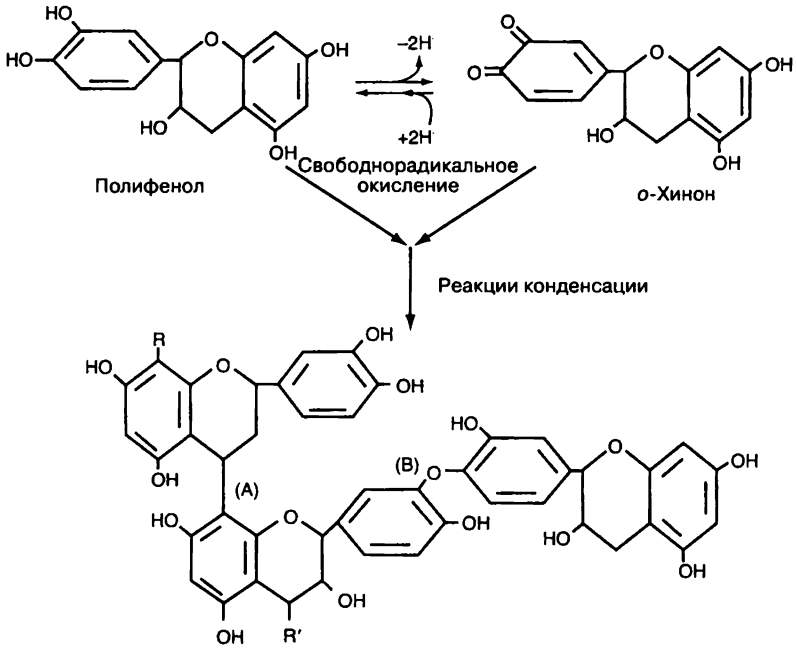
(XVIII) *D*-Камфора

Освежающее действие родственных мяте соединений по механизмам химической реакции отличается от легкого «холодка», вызываемого подсластителями на основе полиолов (см. главы 3 и 11) типа кристаллического ксилита. Считается, что эффект такого легкого «холодка» обусловлен эндотермическим растворением.

10.2.9. Вяжущие вещества

Вяжущее действие связано с осязательными ощущениями сухости в полости рта, сопутствующими резкому сморщиванию ее тканей [46]. Вяжущий вкус обычно является результатом связывания таннинов или полифенолов (см. главу 9) с белками слюны с образованием осадков или агрегатов. Кроме того, среднерастворимые белки (типа присутствующих в определенных типах сухого молока) могут соединяться с белками и мукополисахаридами слюны, вызывая тем самым вяжущее (терпкое) ощущение. Вяжущий вкус зачастую путают с горечью из-за того, что многие люди не вполне понимают природу терпкости, а многие полифенолы и таннины вызывают одновременно и вяжущее, и горькое ощущения (например, при употреблении красных вин) [1].

Таннины с более сильным вяжущим вкусом — это часто конденсированные таннины, образующиеся при окислительных реакциях. Для молекул этих соединений характерны большие площади поперечного сечения (рис. 10.9), удобные для образования гидрофобных ассоциаций с белками. В таннинах много фенольных групп, способных превращаться в хиноидные структуры, которые, в свою очередь, могут образовывать поперечные сшивки с белками [58]. Такие поперечные сшивки и способствуют формированию вяжущего вкуса.



Конденсированный таннин процианидинового типа, дающий вяжущий вкус

Рис. 10.9. Схема реакции образования таннина процианидинового типа с большими планарными гидрофобными участками, способными к ассоциации с белками и, соответственно, к формированию вяжущего вкуса

Вяжущий вкус может быть желаемым вкусовым свойством (например, для чая), но добавление к чаю молока или сливок подавляет вяжущий вкус из-за связывания полифенолов с молочными белками. Хорошим примером напитка с одновременно и вяжущим, и горьким вкусом может служить красное вино, так как в нем содержатся полифенолы или таннины. Вместе с тем слишком сильный вяжущий вкус вина считается органолептически нежелательным, и часто принимают определенные меры по снижению содержания полифенольных таннинов, относящихся к антоцианиновым пигментам. Вяжущий вкус незрелых бананов, обусловленный полифенолами, может придать нежелательный побочный привкус продуктам, приготовленным с добавлением таких бананов [23].

10.3. Вкусоароматические вещества плодов, овощей и специй

Разделить вкусоароматические вещества плодов и овощей на относительное небольшое число групп — задача не простая, так как к этим видам сырья не всегда применима группировка на основе логического подхода. Например, часть информации по вкусовым веществам растительного происхождения представлена в разделе, посвященном жгучим веществам (10.2.7), а часть будет рассматриваться в разделе, посвященном разработке реакционноспособных вкусоароматических веществ (10.7). Ниже мы основное внимание уделим биогенезу и развитию вкуса и аромата в отдельных наиболее важных плодах и овощах. Информацию по другим вкусоароматическим веществам плодов и овощей можно найти в соответствующей литературе (см., например, работы [11, 49, 64]).

10.3.1. Серосодержащие летучие вещества в растениях рода луковых

Для растений рода луковых (*Allium sp.*) характерен сильный, все пропитывающий запах. Наиболее важными представителями этого рода растений являются разновидности репчатого лука, чеснок, лук-порей, шнитт-лук, а также некоторые сорта лука-шалот, которые не имеют сильного характерного запаха, если растительные ткани еще не повреждены, а ферменты не декомпартментализованы (все это не позволяет предшественникам вкусоароматических веществ превратиться в летучие ароматические вещества). У разновидностей репчатого лука (*A. cepa L.*) предшественником серосодержащих соединений, ответственных за луковые запах и вкус, является *S*-(1-пропенил)-*L*-цистеинсульфоксид [70, 86], который помимо этого обладает вкусовыми свойствами кокуми (см. раздел 10.2.6) и в виде замещенного цистеинсульфоксида выявлен также в луке-порее.

При быстром гидролизе S-(1-пропенил)-*L*-цистеинсульфоксида аллиназой (ферментом репчатого лука) образуется (наряду с аммонием и пируватом) нестабильное промежуточное соединение — сульфеновая кислота (рис. 10.10), которая подвергается дальнейшим перегруппировкам с образованием слезо-

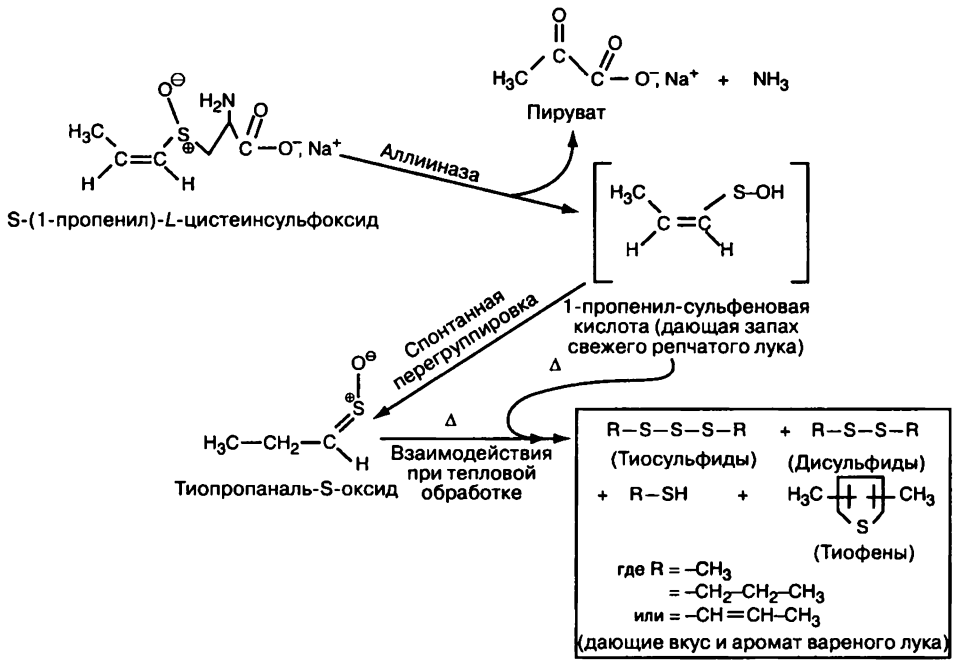


Рис. 10.10. Реакции образования вкусоароматических веществ репчатого лука

точивого вещества (лакриматора) тиопропанол-S-оксида, также ассоциируемого с общим ароматом репчатого лука. Пировиноградная кислота, образующаяся в результате ферментативного превращения этого предшественника, является стабильным продуктом реакции и может служить косвенным показателем вкусоароматической насыщенности луковых продуктов. Часть нестабильной сульфеновой кислоты разлагается на довольно большое число соединений — меркаптанов, дисульфидов, трисульфидов и тиофенов. Продолжение процесса образования этих соединений и других производных дает вкусоароматические вещества, которые и формируют комплексную вкусоароматику лука после кулинарной обработки.

Вкус и запах чеснока (*Allium sativum L.*) образуется по тому же общему механизму, за исключением того, что в этом случае предшественником является S-(2-пропенил)-*L*-цистеинсульфоксид [70]. В создании вкуса и запаха чеснока участвует диаллилтиосульфинат (аллицин) (рис. 10.11), а S-оксидный лакриматор, подобный образующемуся в репчатом луке, в чесноке не образуется. Тиосульфинатное вкусоароматическое соединение чеснока разлагается и перестраивается во многом аналогично сульфеновой кислоте репчатого лука с образованием метил-, аллил- и диаллилдисульфидов, а также других вкусоароматических соединений чесночного масла и чеснока, прошедшего кулинарную обработку.

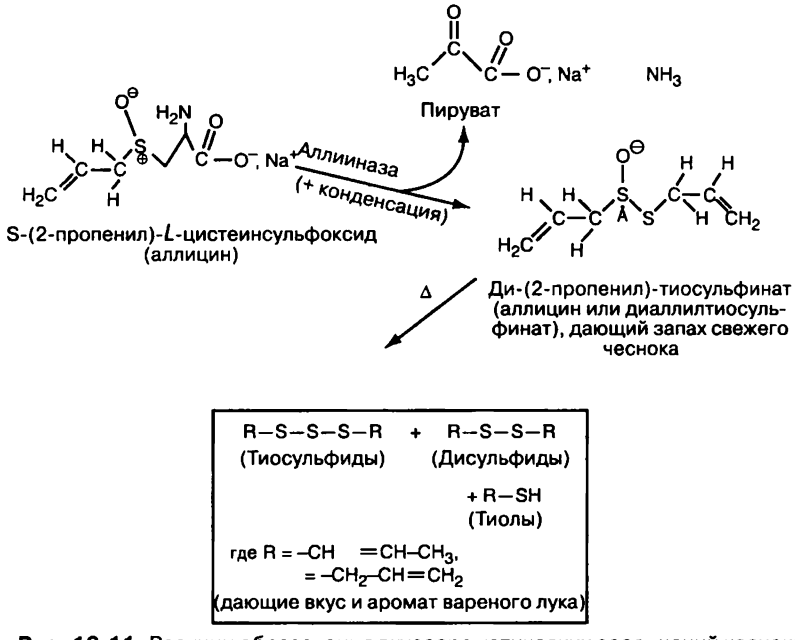


Рис. 10.11. Реакции образования вкусоароматических соединений чеснока

10.3.2. Серосодержащие летучие вещества растений семейства крестоцветных

К семейству крестоцветных (*Cruciferae*) относятся растения рода *Brassica* — кочанная капуста (*Brassica oleracea capitata L.*), брюссельская капуста (*Brassica oleracea var. gemmifera L.*), турнепс (*Brassica rapa var. rapa L.*), горчица сарептская (*Brassica juncea Coss.*), а также кресс-салат (*Nasturtium officinale R. Br.*), редька (*Raphanus sativus L.*) и хрен (*Armoracia lapathifolia Gilib*). Как мы уже отмечали в разделе 10.2.7, активные жгучие соединения в растениях семейства *Cruciferae* являются летучими и, следовательно, участвуют в формировании характерного для этих растений запаха. Более того, жгучие соединения, присутствующие в крестоцветных, зачастую вызывают резкое раздражение в носовой полости и слезоточивый эффект. Вкусоароматические соединения в этих растениях образуются в ходе ферментативных процессов при разрушении тканей и в процессе кулинарной обработки.

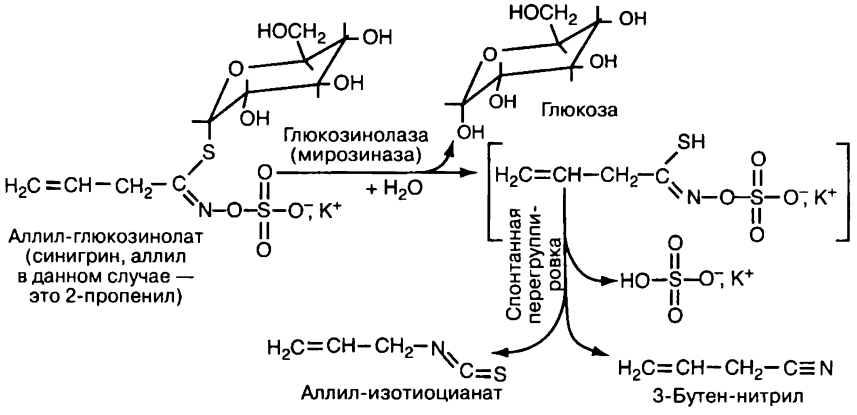
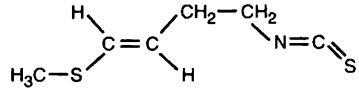


Рис. 10.12. Реакция образовании вкусоароматических соединений в растениях семействе крестоцветных

Запах разрушенных тканей свежих растений обусловливается прежде всего изотиоцианатами, образующимися в результате действия глюкозинолаз на тиогликозидные предшественники. Примером механизма образования вкуса и аромата свежих овощей семейства крестоцветных может служить реакция, приведенная на рис. 10.12. Основным источником жгучего вкуса и запаха хрена и горчицы является аллилизотиоцианат [24].

В растениях семейства крестоцветных встречаются несколько глюкозинолатов (S-гликозидов, см. главу 12) [70], каждый из которых является источником характерного запаха. Легкая жгучесть некоторых видов редьки обусловлена 4-метилтио-3-*т*-бутенилизотиоцианатом. Помимо изотиоцианатов глюкозинолаты образуют также тиоцианаты и нитрилы.



(XIX) 4-метилтио-3-*т*-бутенилизотиоцианат (в редьке и редисе)

Хотя в свежем виде кочанная и брюссельская капуста не обладают сильными жгучими свойствами, в них могут содержаться как аллил-изотиоцианат, так и аллил-нитрил, причем их концентрация варьирует в зависимости от стадии роста, локализации в съедобной части растения и режимов переработки. Переработка при температурах значительно выше температуры окружающей среды (тепловая обработка и дегидратирование) обычно разрушают изотиоцианаты и повышают содержание нитрилов и других серосодержащих соединений, образующихся при распаде и перегруппировке изотиоцианатов. В растениях семейства крестоцветных встречаются несколько ароматических изотиоцианатов — так, одним из основных ароматических соединений кресс-салата является 2-фенилэтилизотиоцианат, который участвует также в формировании ощущения острого вкуса, свойственного блюдам с кресс-салатом.

10.3.3. Уникальное серосодержащее соединение в грибах шиитаке

Для грибов шиитаке (*Lentinus edodes*) * характерна необычная ферментная вкусоароматическая система C-S-лиазы. Эти грибы высоко ценятся в Японии и других странах за их уникальный приятный вкус и запах. Предшественником основного вкусоароматического соединения (лентиновой кисло-

* Шиитаке (лат. *Lentinula edodes*) — съедобный гриб, выращиваемый обычно на деревьях кастанопсиса длинноостроконечного (*Castanopsis cuspidata*). — *Примеч. ред.*

ты) является *S*-замещенный *L*-цистеинсульфоксид, присутствующий в связанном виде в составе γ-глютамилпептида [90]. В начале ферментативного развития вкуса и аромата участвует γ-глютамилтранспептидаза, в результате чего высвобождается лентиновая кислота, которая затем подвергается действию S-алкил-*L*-цистеинсульфоксидлиазы с образованием продуктов реакции, впоследствии образующих лентионин — активное вкусоароматическое соединение, характерное для грибов шиитаке (рис. 10.13). Все эти реакции инициируются только после разрушения грибной ткани, а максимальные вкус и аромат развиваются лишь после сушки и дегидратации или после длительного выдерживания свежевымоченной (мацерированной) ткани. Наряду с лентионином образуются и другие политиепаны, вносящие вклад в общий сернистый запах этих грибов [37,70].

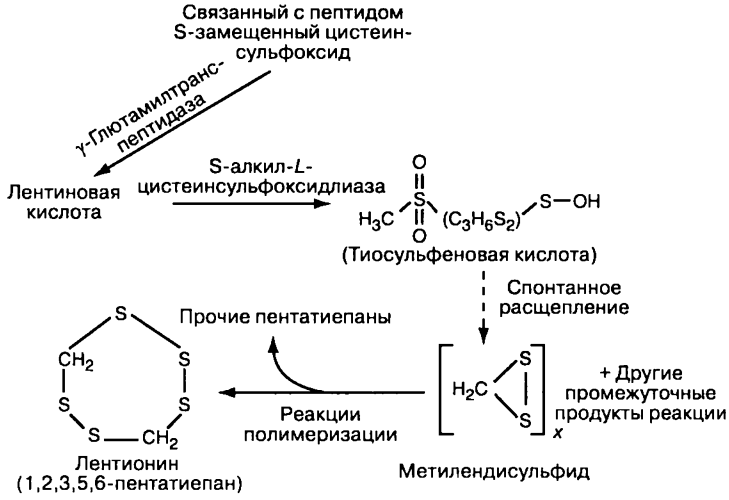


Рис. 10.13. Реакции, участвующие в образовании лентионина в грибах шиитаке

10.3.4. Метокси-алкилпиразиновые летучие соединения овощей

Многим свежим овощам присущи характерные зеленной и землистый запахи, которые зачастую обусловлены метокси-алкилпиразинами [86]. Кроме того, в последнее время эти метокси-алкилпиразины стали связывать с букетами определенных виноградных вин. Данные соединения обладают очень сильным и резким запахом, и их присутствие обеспечивает наличие стойкого характерного аромата. Из соединений этого класса первым был открыт 2-метокси-3-изобутилпиразин, который дает сильный аромат паприки (пороговый уровень — 0,002 мкг/кг). Значительная часть запаха сырого картофеля, зеленого горошка и гороховых стручков обусловлена 2-метокси-3-изопропилпиразином, а в образовании запаха сырых корнеплодов красной свеклы участвует 2-метокси-3-втор. бутилпиразин. Эти соединения образуются в растениях путем биосинтеза, и эти уникальные вещества активно продуцируются некоторыми штаммами микроорганизмов (в частности, псевдомонадами — *Pseudomonas perolens* и *tetrolens*) [53]. Предшественниками метокси-алкилпиразиновых летучих соединений служат аминокислоты с разветвленными цепями (гипотетическая схема приведена на рис. 10.14).

10.3.5. Ферментативно образующиеся летучие соединения жирных кислот

В формировании вкуса и запаха плодов и овощей большую роль играют летучие соединения, ферментативно образующиеся из высокомолекулярных жирных кислот. Кроме того, подобные реакции могут стать причиной появления побочных запахов (например, переработанной сои). Более подробно эти реакции рассматриваются в главах 4 (белки) и 6 (ферменты).

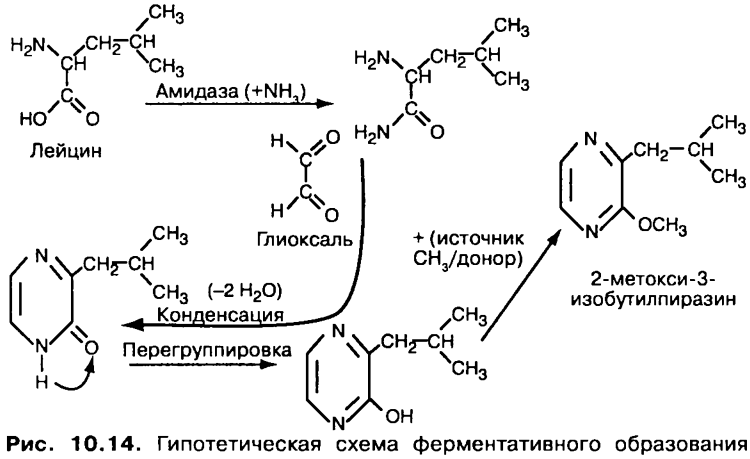


Рис. 10.14. Гипотетическая схема ферментативного образования метокси-алкилпиразинов

10.3.5.1. Ароматические соединения растений, образовавшиеся в результате действия липоксигеназы

В растительных тканях ферментативное окислительное расщепление ненасыщенных жирных кислот широко распространено и приводит к образованию характерного запаха, ассоциируемого с созреванием некоторых фруктов и поврежденными растительными тканями [19]. При ферментативном образовании этих соединений (в отличие от спонтанного образования вкусоароматических производных липидов путем самоокисления) образуются очень характерные ароматические вещества. Ферментная специфичность образования вкусоароматических соединений показана на рис. 10.15, где из ненасыщенных жирных кислот образуются 1-октен-3-он, *t*-2-*c*-6-нонадиеналь и *t*-2-гексеналь. Эти соединения дают запахи, характерные соответственно для свежих грибов, огурцов и помидоров. Сайт-специфичное перекисное окисление свободных жирных кислот регулируется конкретными липоксигеназами и последующими реакциями расщепления лиазами. В результате из молекулы жирной кислоты образуются оксокислоты, но они, по-видимому, на запах не влияют.

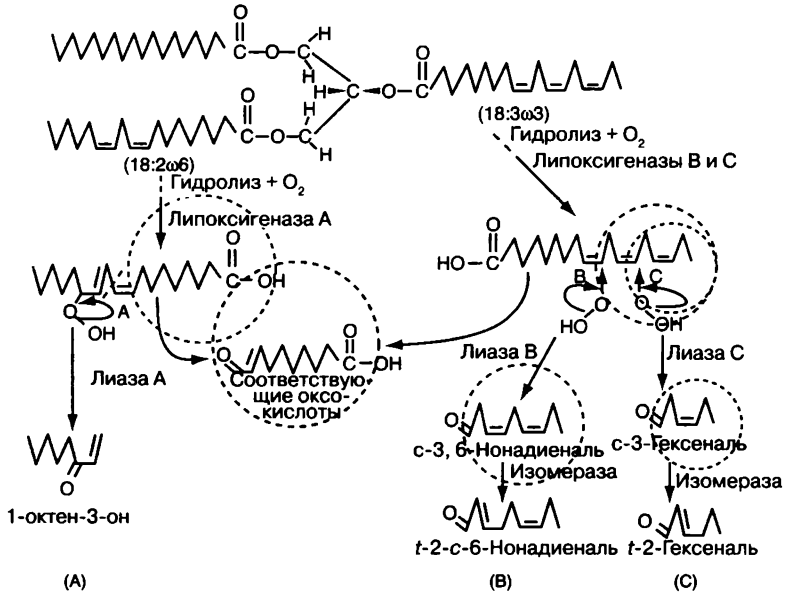


Рис. 10.15. Образование управляемых липоксигеназой карбонильных соединений из ненасыщенных жирных кислот: (A) важных в свежих грибах; (B) важных в огурцах; (C) важных в свежих томатах

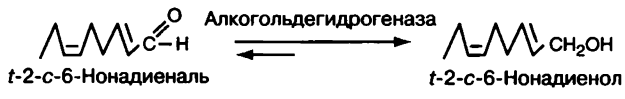


Рис. 10.16. Превращение альдегида в соответствующий спирт с медленным изменением запаха

Для начала этой и других реакций необходима декомпартментализация ферментов, и по мере последующих реакций общий запах со временем меняется. Так, образующиеся под действием липоксигеназы альдегиды и кетоны превращаются в соответствующие спирты (рис. 10.16), которые обычно характеризуются более высоким порогом обнаружения и более насыщенным запахом, чем исходные карбонильные соединения. Кроме того, присутствующие также *цис-транс*-изомеразы превращают *цис*-3-связи альдегидов в *транс*-2-связи (см. рис. 10.15), и вследствие этих структурных изменений меняется запах альдегидов. Как правило, соединения с шестью атомами углерода дают аромат зелени («свежескошенной травы»), с девятью — запах огурцов и дыни, а с восемью — грибов, листьев фиалки и герани [79]. Соединения с шестью и девятью атомами углерода являются первичными спиртами и альдегидами, а восемью — вторичными спиртами и кетонами.

10.3.5.2. β-окисление высокомолекулярных жирных кислот с образованием летучих соединений

По мере созревания груш, персиков, абрикосов и других плодов развиваются приятные фруктовые ароматы. При этом зачастую преобладают летучие соединения со средней длиной цепи (C_6–C_{12}), образующиеся из высокомолекулярных жирных кислот путем β-окисления [80]. Образование этил-дека-2-*t*,4-*c*-диеноата показано на рис. 10.17 — этот эфир является основным активным и характерным ароматическим веществом груш сорта Бартлетт. Несмотря на то что в эту схему не включены гидроксикислоты (C_8–C_{12}), они также образуются в ходе общего ферментативного процесса и легко циклизуются с образованием

γ- и δ-лактонов. Аналогичные реакции происходят в ходе метаболизма и биосинтеза молочного жира (подробнее о них см. раздел 10.5). Для лактонов с длиной цепи C_8–C_{12} характерны явно выраженные кокосовый и персиковый ароматы.

10.3.6. Летучие вещества из аминокислот с разветвленной цепью

Аминокислоты с разветвленной цепью являются важными предшественниками биосинтезируемых соединений, ассоциируемых с запахом некоторых созревающих плодов, особенно бананов и яблок, поскольку значительная часть запаха этих зрелых фруктов обусловлена летучими веществами, образующимися из аминокислот [80]. Начальную реакцию при образовании аромата (рис. 10.18) иногда называют ферментативным расщеплением Штрекера. При этом происходят процессы трансаминирования и декарбоксилирования, аналогичные процессам при развитии неферментативного потемнения (реакции Майяра). Таким же образом модифицировать большинство аминокислот могут некоторые микроорганизмы, включая хлебопекарные дрожжи и штаммы *Lactococcus lactis*, дающие солодовый запах. В растениях могут также продуцироваться сходные производные и других аминокислот, не только лейцина — например, этими реакциями бывает обусловлено присутствие 2-фенилэтанола, дающего сладкий запах цветущих розы или лилии.

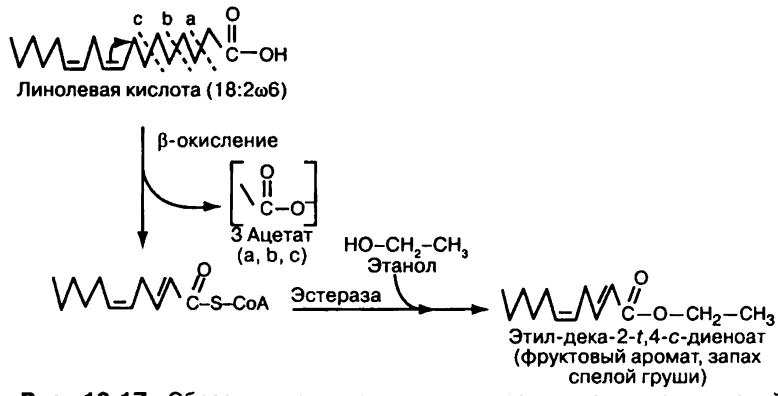


Рис. 10.17. Образование основных вкусоароматических соединений в зрелых грушах путем β-окисления линолевой кислоты с последующей этерификацией

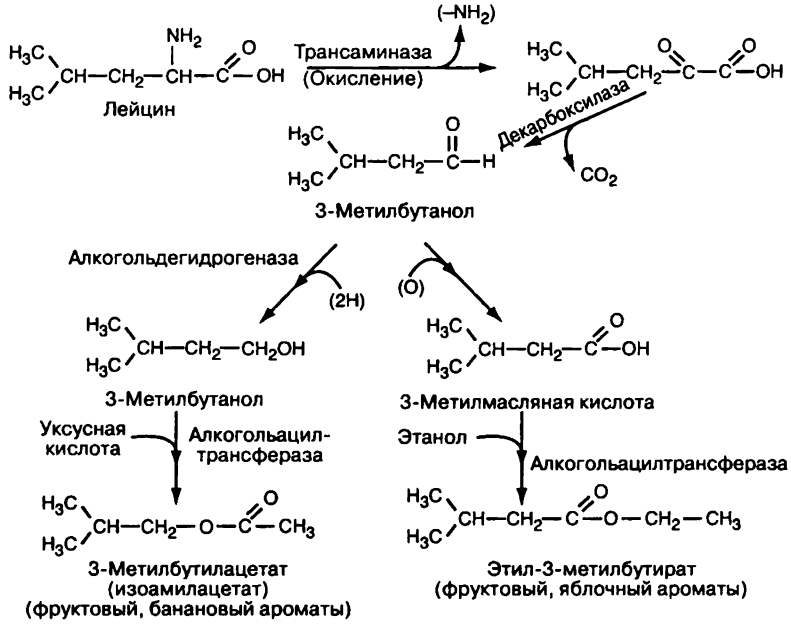


Рис. 10.18. Ферментативное превращение лейцина в летучие ароматические соединения при созревании плодов

Несмотря на то что альдегиды, спирты и кислоты этих реакций непосредственно участвуют в формировании ароматов созревающих фруктов, характерными доминантными соединениями все-таки являются эфиры. Уже давно известно, что в аромате банана важную роль играет изоамилацетат (3-метилбутилацетат), но чтобы обеспечить полный ароматический букет банана необходимы и другие соединения. В яблоках этил-2-метилбутират дает даже «более яблочный» запах, чем этил-3-метилбутират, и именно это соединение является доминирующим в аромате зрелых яблок сорта Делишес (*Delicioуos*).

10.3.7. Ароматические вещества, образующиеся по метаболическому пути шикимовой кислоты

В системах биосинтеза метаболический путь шикимовой кислоты обеспечивает образование ароматических соединений, связанных с шикимовой кислотой. Этот путь лучше всего известен по его роли в об-

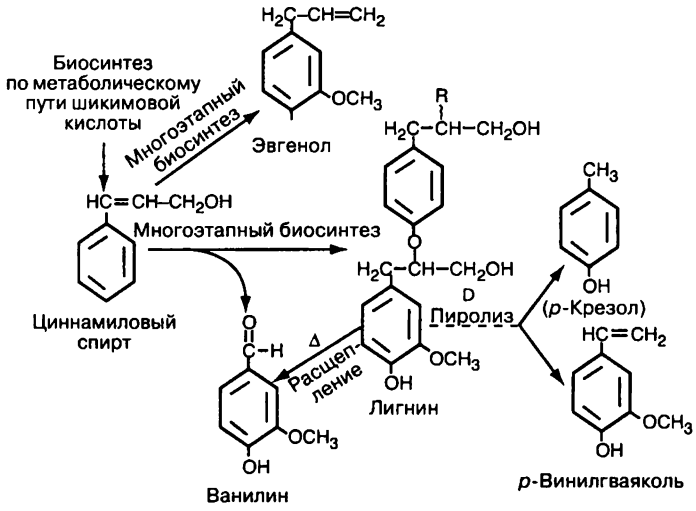


Рис. 10.19. Образование некоторых ароматических соединений из соответствующих предшественников по метаболическому пути шикимовой кислоты

разовании фенилаланина и других ароматических аминокислот. Помимо ароматических соединений-производных ароматических кислот по метаболическому пути шикимовой кислоты образуются и другие летучие соединения, зачастую ассоциируемые с эфирными маслами (рис. 10.19). По этому же пути образуется и фенилпропаноидный каркас лигниновых полимеров, являющихся основными структурными элементами растений. При пиролизе из лигнина образуются различные фенолы [87], и характерный дымный аромат пищевых продуктов в значительной степени обусловлен соединениями, образующими из соответствующих предшественников по метаболическому пути шикимовой кислоты.

Из рис. 10.19 видно, что ванилин, наиболее важный характеристический компонент ванильных экстрактов, можно получать по этому пути естественным образом и как побочный продукт при переработке лигнина (древесной массы и бумаги*). Ванилин биохимически синтезируется в стручке ванили, где он нативно присутствует преимущественно в виде ванилинового глюкозида до тех пор, пока гликозидная связь не будет гидролизована при ферментировании. Метоксилированные ароматические кольца активных жгучих веществ в имбире, черном перце и перце чили (см. раздел 10.2.7) также содержат многие важные компоненты, представленные на рис. 10.19. Коричный спирт представляет собой ароматический компонент корицы как пряности, а эвгенол — это основное активное жгучее соединение гвоздики.

10.3.8. Роль летучих терпеноидов в формировании вкуса и аромата

Из-за распространенности терпенов в растительном сырье для парфюмерной промышленности и производства эфирных масел их важная роль в образовании других запахов растений иногда недооценивается. Терпены во многом обусловливают ароматы цитрусовых и многих приправ и трав. Летучие терпеновые соединения в низких концентрациях присутствуют в некоторых плодах, а также обусловливают часть за-

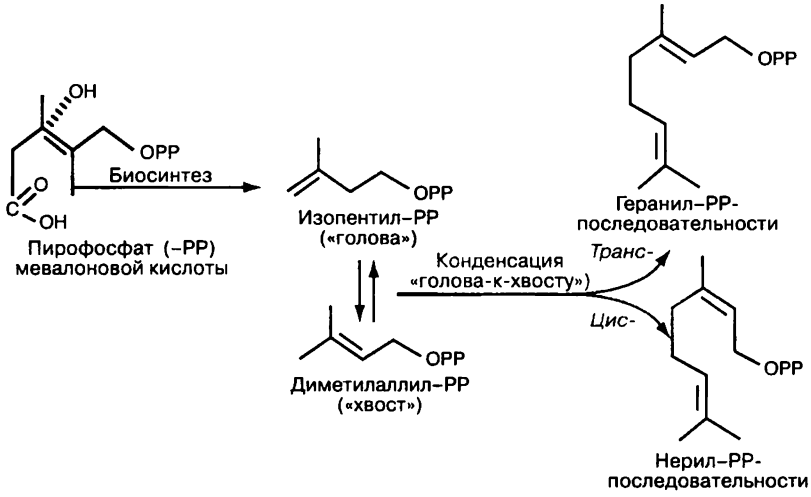
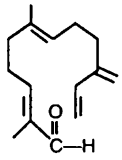


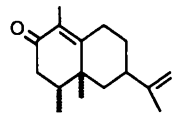
Рис. 10.20. Обобщенная схема биосинтеза монотерпенов по изопреноидному пути

* Этим же объясняется появление ванильного аромата у коньячных спиртов, длительно выдерживавшихся в дубовых бочках. — *Примеч. науч. ред.*

паха сырой моркови. Биосинтез терпенов осуществляется по изопреноидному (C_5) пути (рис. 10.20), при этом монотерпены содержат 10 атомов углерода, а сесквитерпены 15. Последние являются также важными характерными ароматическими соединениями, примером которых могут служить β-синесал и нооткатон, так как именно они придают характерные ароматы соответственно апельсину и грейпфруту. Молекулы дитерпенов (C_{20}) являются слишком крупными и нелетучими, и поэтому непосредственно не участвуют в формировании аромата.

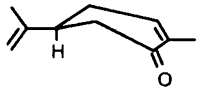


(XX) β-Синесал (в апельсине)

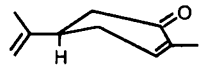


(XXI) Нооткатон (в грейпфруте)

Летучие терпены зачастую обладают очень сильным характерным запахом, и многие из них можно легко идентифицировать опытным путем по запаху натурального сырья. Оптические изомеры (то есть зеркальные отображения структуры) терпенов, а также других нетерпеноидных соединений могут давать совершенно разные запахи [12, 42, 55]. Среди терпенов наиболее изучены карвоны — аромат *d*-карвона [4S-(+)-карвона] специфичен для запаха тмина, а *l*-карвона [4R-*(—)*-карвона] — для запаха мяты колосовой. Исследования таких пар соединений представляют особый интерес, поскольку они дают информацию относительно фундаментального процесса обоняния и структурно-активных взаимоотношений молекул.



4*S*-(+)-карвон (тминоподобный аромат)



4*R-(*–)-карвон (аромат мяты колосовой)

10.3.9. Ароматические соединения цитрусовых

Цитрусовые ароматы относятся к числу наиболее популярных ароматов свежих фруктов, а также в к самым популярным ароматам напитков. Большинство данных по химии натуральных ароматических соединиений цитрусовых стали результатом изучения процессов переработки соков, эфирных масел кожуры цитрусовых, а также эфирных масел и водных эссенций, применяемых для ароматизации сокосодержащих напитков. Основными источниками аромата цитрусовых являются несколько классов вкусоароматических соединений, в том числе терпены, альдегиды, эфиры и спирты, причем в различных экстрактах отдельных цитрусовых идентифицированы большое количество летучих соединений [71]. Вместе с тем численность важнейших ароматических соединений цитрусовых ограничена относительно небольшим их количеством (табл. 10.2).

Для апельсинов и мандаринов (в США наряду с мандарином широко распространен танжерин) характерны нежные ароматы, которые при использовании ароматических веществ зачастую взаимозаменяемы. Из табл. 10.2 следует, что для формирования этих ароматов важны относительно небольшое число альдегидов и терпенов, а также некоторые другие соединения. В апельсиновом и мандариновом ароматах присутствуют и α-, и β-синесал, причем α-синесал особенно важен для формирования цитрусового аромата спелого апельсина в мандариновых ароматизаторах. Для грейпфрута характерны два соединения — нооткатон и 1-*p*-метен-8-тиол, которые обеспечивают его легко распознаваемый аромат. Нооткатон широко используется для создания искусственного грейпфрутового аромата, а *p*-метен-8-тиол принадлежит к небольшому числу сернистых соединений, важных для аромата цитрусовых.

В формировании лимонного аромата участвуют большое число эссенциальных соединений, причем лимонные ароматизаторы в присутствии некоторых терпеновых эфиров становятся лучше. Аналогичным образом в формировании аромата лайма участвует большое число эфирных соединений, и обычно используются два типа эфирных масел лайма. Основным промышленно выпускаемым эфирным маслом лайма является масло мексиканского лайма после перегонки, обладающее резким и сильным ароматом лайма, благодаря чему оно стало популярным ароматизатором для безалкогольных напитков на осно-

Таблица 10.2
Некоторые важнейшие летучие ароматические соединения цитрусовых. По [71]

Ароматы			
Апельсиновый	**Мандариновый**	**Грейпфрутовый**	**Лимонный**
Этанол	Этанол	Этанол	Нераль
Октанол	Октанол	Деканаль	Гераниаль
Нонаналь	Деканаль	Этилацетат	β-Пинен
Цитраль	α-Синесал	Метилбутаноат	Гераниол
Этилбутаноат	γ-Терпинен	Этилбутаноат	Геранилацетат
d-Лимонен	β-Пинен	*d*-Лимонен	Нерилацетат
α-Пинен	Тимол	Нооткатон	Бергамотин
	Метил-N-метил-антранилат	1-*p*-метен-8-тиол	Кариофиллен
			Карвиловый этиловый эфир
			Линалиловый этиловый эфир
			Фенхил-этиловый эфир
			Метилэпижасмонат

ве лимона и лайма, а также колы. В настоящее время растет популярность эфирного масла персидского лайма холодного прессования и центрифугированных эфирных масел мексиканского лайма, так как им присущ «более натуральный» аромат. Менее жесткие по сравнению с перегонкой режимы переработки, применяемые в холодном прессовании и центрифугировании, обеспечивают более длительное действие некоторых важных ароматических соединений свежего лайма. Например, цитраль, дающий желательный «свежий» аромат, разлагается при перегонке в кислых условиях до *p*-цимена и α–*p*-диметилстирена, дает более резкий запах, и в ходе этих превращений формируются более резкий аромат эфирного масла лайма, получаемого перегонкой [71].

Цитрусовые эфирные масла и терпеносодержащие ароматические экстракты можно разделить на неокисленные (углеводородные) и окисленные фракции, используя соответственно хроматографические методы на силикагелевом адсорбенте с элюированием неполярными и полярными растворителями. В апельсиновом эфирном масле с пониженным содержанием терпенов, например, присутствуют преимущественно окисленные терпены, альдегиды и спирты, выделенные из апельсиновых эфирных масел. Благодаря своему более высоким ароматическим свойствам фракции окисленных терпенов зачастую более желательны в ароматизаторах, чем неокисленные.

10.3.10. Вкусоароматические вещества трав и специй

Несмотря на то что между производственниками, национальными и международными контрольно-регламентирующими органами существуют некоторые расхождения относительно используемых терминов и определений, травы и специи, как правило, считаются натуральными продуктами растительного происхождения, используемыми для придания пищевым продуктам характерного вкуса, пикантности и аромата. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (*FDA*) исключила луковичные (лук и чеснок) из классификации специй, однако по международной и промышленной классификации они обычно к ним относятся. В нормативных документах сохраняется также термин «приправы» (*condiments*), которыми считаются средствами улучшения вкуса пищи или острыми добавками. Имеется мнение, что этот термин не следует применять (за исключением лишь некоторых ситуаций), так как он, как правило, не дает основания для включения ароматического растительного сырья в системы классификации.

В некоторых ботанических системах классификации травянистое кулинарное сырье отделено от специй — к нему относят такие ароматические растения с мягким стеблем, как базилик, майоран, мяту, орегано, розмарин и тмин, а также листья ароматических кустарников (шалфей) и деревьев (лавр). В подобных классификациях к специям относят лишь остальное ароматическое растительное сырье, используемые для придания пище вкуса или пикантности. В таких специях — корневищах или корнях (имбирь), коре

(корица), цветочных почках (гвоздика), плодах (укроп, перец) и семенах (мускатный орех, горчица) обычно отсутствует хлорофилл.

Специи и травы используются с античных времен для придания пищевым продуктам и напиткам особого вкуса, остроты и пикантности, а также для усиления характерного вкуса данного продукта или напитка. Кроме того, некоторые травы и специи нашли широкое применение в парфюмерии и производстве лекарственных средств на основе растительного сырья (многие лекарственные травы обладают антиоксидантным и противомикробным действием). Несмотря на то что существует огромное число трав и специй, часть которых используется в парфюмерной и фармацевтической промышленности, официально признаны полезными для здоровья ингредиентами пищевых продуктов лишь около 70. При этом вкусоароматические характеристики у конкретной специи широко варьируют в зависимости от места выращивания и генетических изменений, что позволяет обеспечить широкий диапазон вкуса и аромата пищевых продуктов. Далее мы рассмотрим лишь те травы и специи, которые традиционно используются в пищевой промышленности для придания вкуса и аромата.

Специи, как правило, получают из тропических растений, тогда как травы — из субтропических или растений умеренного климата. Кроме того, в специях обычно содержатся высокие концентрации фенилпропаноидов, образующихся по пути метаболизма шикимовой кислоты (например, эвгенол в гвоздике, см. рис. 10.19), а в травах — высокие концентрации *p*-ментаноидов, образующихся в процессе биосинтеза терпенов (например, ментол в мяте перечной).

Для специй и трав характерно высокое содержание различных летучих соединений, однако в большинстве случаев характерный аромат и вкус этому растительному сырью конкретные летучие соединения, присутствующие как высоких, так и в низких концентрациях. Эти вкусоароматические соединения основных трав и специй, используемых в пищевой промышленности, приведены соответственно в табл. 10.3 и 10.4 [12, 64]. Успех применения трав и специй в производстве пищевых продуктов и напитков зависит от хорошего знания особенностей этого вида сырья, а также доминантных и тонких вкусоароматических нот, вносимых вкусоароматическими веществами. В приводимых ниже таблицах показано, какие специи и травы дают родственные вкусоароматические вещества, а также какой тип вкуса и аромата можно ожидать от их использования. Кроме того, не следует забывать, что существует большое число соединений, которые хотя и оказывают меньшее влияние на общий вкус и аромат специй и трав, участвуют в формировании их уникальных вкусоароматических характеристик.

Таблица 10.3

Важнейшие вкусоароматические соединения некоторых кулинарных трав, обычно применяемых в пищевой промышленности для придания вкуса и аромата. По [12, 64]

Травы	Часть растения	Важнейшие вкусоароматические соединения
Базилик сладкий	Листья	Метилкавикол, линалоол, метилэвгенол
Душица	Листья	Тимол, карвакрол
Лавр благородный	Листья	1,8-Цинеол
Майоран	Листья, цветки	*c* и *t*-Сабинена гидраты, терпинен-4-ол
Мята колосовая	Листья	l-Карвон, производные карвона
Мята перечная	Листья	l-Ментол, ментон, ментофуран
Орегано	Листья, цветки	Карвакрол, тимол
Розмарин	Листья	Вербенол, 1,8-цинеол, камфара, линалоол
Тимьян	Листья	Тимол, карвакрол
Чабер	Листья	Карвакрол
Шалфей далматинский*	Листья	Туйон, 1,8-цинеол, камфара
Шалфей испанский**	Листья	*c* и *t*-Сабинилацетат, 1,8-цинеол, камфара
Шалфей мускатный	Листья	Сальвиаль-4(14)-ен-l-он, линалоол
Эстрагон	Листья	Метилкавикол, анетол

* Шалфей далматинский более известен как шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*). — *Примеч. перев.*

** Шалфей испанский более известен как шалфей лавандолистный или узколистный (*Salvia lavandulifolia*). —*Примеч. перев.*

Таблица 10.4

Важнейшие вкусоароматические соединения некоторых специй, обычно применяемых в пищевой промышленности для придания вкуса и аромата. По [12, 64]

Специя	Часть растения	Важные вкусоароматические соединения
Анис	Плоды	(*E*)-Анетол, метилкавикол
Ваниль	Плоды, семена	Ванилин, *p*-ОН-бензилметиловый эфир
Гвоздика	Цветочные почки	Эвгенол, эвгенилацетат
Горчица	Семена	Аллилизотиоцианат
Имбирь	Корневище	Гингерол, шогаол, нераль, гераниаль
Кардамон	Плоды	α-Терпинилацетат, 1,8-цинеол, линалоол
Кориандр	Плоды	*d*-линалоол, C_{10}–C_{14}-2-алкеналы
Корица, кассия	Кора, листья	Цинамальдегид, эвгенол
Кумин	Плоды	Куминальдегид, *p*-1,3 -ментадиеналь
Куркума	Корневище	Тумерон, цингиберен, 1,8-цинеол
Мацис (мускатный цвет, присемянник мускатного ореха)	Шелуха	α-Пинен, сабинен, l-терпенин-4-ол
Мускатный орех	Семена	Сабинен, α-пинен, миристицин
Перец	Плод	Пиперин, -3-карен, β-карофиллен
Перец гвоздичный (пименто или душистый перец)	Плоды, листья	Эвгенол, β-кариофиллен
Петрушка	Листья, семена	Апиол
Стручковый перец	Плоды	Капсаицин, дигидрокапсаицин
Тмин	Плоды	*d*-Карвон, производные карвона
Укроп	Плоды, листья	Анетофуран, *d*-карвон
Фенхель	Семена	(*E*)-Анетол, фенхон
Шафран	Рыльца пестиков	Сафранал

10.4. Вкусоароматические продукты молочнокислого и спиртового брожения

Повсеместно в образовании вкусоароматических веществ участвуют микроорганизмы, но зачастую их роль в химии образования ароматических веществ при брожении до конца не известна, или продуцируемые ими вкусоароматические соединения не оказывают характерного воздействия на вкус и аромат. Так, большое внимания уделялось ароматам сыров, но кроме характерных ароматических свойств, придаваемых сырам с голубой плесенью метиловыми кетонами и вторичными спиртами, и умеренно выраженного аромата, придаваемого созревающим с поверхности мягким сырам некоторыми соединениями серы вкусоароматические соединения микробиологического происхождения невозможно классифицировать по их характерному воздействию. Аналогичным образом при дрожжевом брожении, широко используемом в производстве пива, вина, других спиртных напитков и хлебобулочных изделий из дрожжевого теста, по-видимому, не образуются ароматические соединения с сильным характеристическими свойствами. Вместе с тем этиловый спирт (этанол) в алкогольных напитках следует рассматривать как вещество с сильным характерным действием.

Основные продукты брожения гетероферментативных молочнокислых бактерий (например, *Leuconostoc citrovorum)* приведены на рис. 10.21. Значительную часть аромата кислосливочного масла и сквашенной пахты обеспечивает сочетание уксусной кислоты, диацетила и ацетальдегида. Гомоферментативные молочнокислые бактерии (например, *Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus)* в молочных культурах продуцируют только молочную кислоту, ацетальдегид и этанол. Характерным соединением для йогурта, который, как правило, получают путем гомоферментативного процесса, является ацетальдегид. В большинстве случаев при молочнокислом брожении смесью штаммов характерным соединением является

диацетил, в связи с чем он приобрел универсальную известность как «ароматизатор молочного или масляного типа». Ацетоин хотя практически и не имеет запаха, может окисляться до диацетила. Поскольку молочная кислота не летуча, то она способствует лишь образованию кислого вкуса у кисломолочных продуктов.

Несколько огрубляя, можно сказать, что молочнокислые бактерии продуцируют очень мало этанола (порядка мг/кг), и в качестве основного финального акцептора водорода в метаболизме они используют пируват. В отличие от них дрожжи в качестве основного конечного продукта метаболизма продуцируют этанол. Кроме того, солодовые штаммы *Lactococcus lactis* и все виды пивоваренных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis*) путем трансаминирования и декарбоксилирования активно превращают аминокислоты в летучие соединения. В примере, приведенном на рис. 10.22, из фенилаланина образуется последовательность летучих ароматических соединений, обычно воспринимаемых как «цветочные» или «розоподобные» ароматы. Зрелые сыры чеддер при чрезмерном образовании фенилэтилового спирта обычно считаются дефектными, так как сыры с розоподобным запахом в прошлом ассоциировали с неконтролируемым молочнокислым брожением, обусловленным плохо вымытым производственным оборудованием.

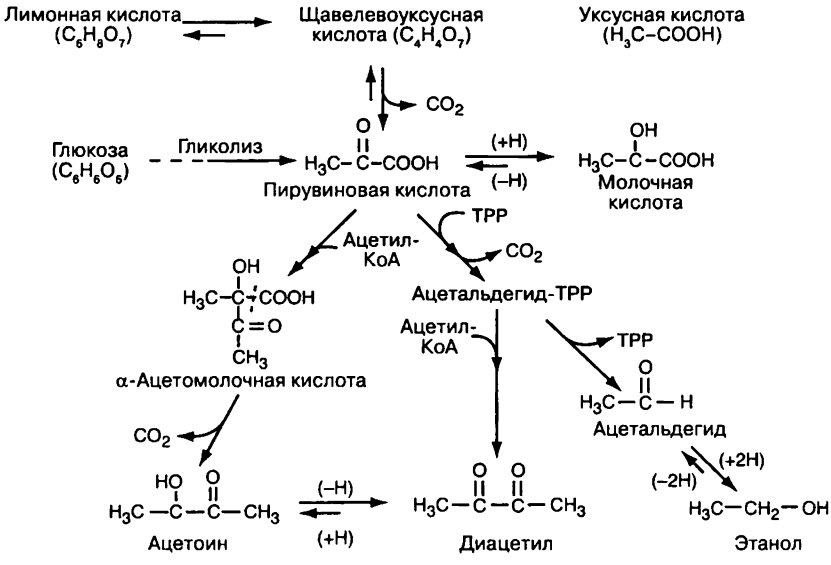


Рис. 10.21. Образование основных ароматических продуктов брожения в процессе метаболизма гетероферментативных молочнокислых бактерий

Реакции, показанные на примере фенилаланина, аналогичны реакциям, рассматривавшимся для аминокислот с разветвленной цепью (см. раздел 10.3.6). Вместе с тем микроорганизмы обычно продуцируют восстановленные формы производных (спирты), хотя образуются и некоторые окисленные соединения (альдегиды и кислоты). Ароматы вина и пива, которые можно отнести непосредственно к результатам брожения, обусловлены сложной смесью летучих веществ и продуктов их взаимодействия с этанолом (например, сложных эфиров и ацеталей). Такие смеси являются источником хорошо известных дрожжевых и фруктовых ароматов, ассоциируемых с напитками брожения.

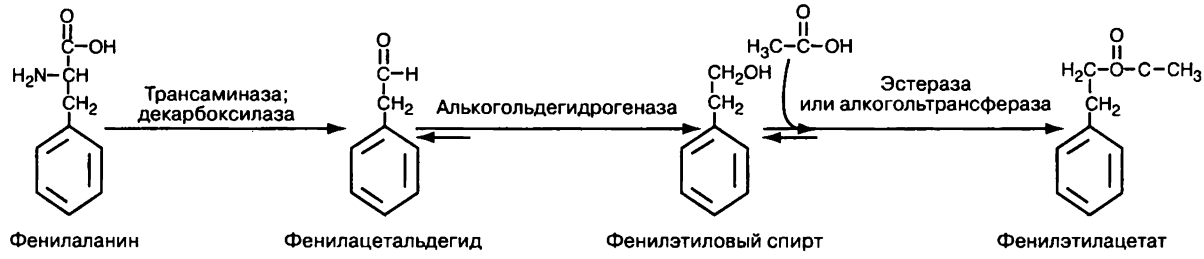


Рис. 10.22. Ферментативное образование микроорганизмами летучих соединений из аминокислот (на примере фенилаланина)

10.5. Ароматические летучие вещества жиров и масел

Жиры и масла из-за их роли в развитии посторонних запахов и привкусов вследствие самоокисления пользуются дурной славой, так что химический состав образующихся из липидов вкусоароматических соединений хорошо изучен [26, 38]. Основными летучими соединениями после самоокисления жиров

являются альдегиды и кетоны, которые могут давать в пищевых продуктах при высоких концентрациях запах печатной краски, жирный, металлический, картонный и парафиновый побочные привкусы. Вместе с тем многие из желаемых ароматов переработанных пищевых продуктов и продуктов после кулинарной обработки являются следствием присутствия этих соединений в умеренных концентрациях. Подробнее о механизмах самоокисления липидов и других путей их расщепления см. главу 4.

10.5.1. Вкусоароматические вещества, образующиеся при гидролизе жиров и масел

Гидролиз ацилглицеринов растительного происхождения и животных жиров приводит в основном к образованию жирных кислот, способных давать мыльный привкус. С другой стороны, молочный жир служит источником летучих ароматических соединений, играющих важную роль во вкусе и аромате молочных продуктов и продуктов на основе молочного жира. Летучие вещества, образующиеся при гидролизе молочного жира, представлены на рис. 10.23, где в качестве примеров отдельных классов соединений служат характерные соединения. Низкомолекулярные жирные кислоты с четным числом атомов углерода (C_4–C_{12}) очень важны для аромата сыров и других молочных продуктов. Наиболее сильной из них является масляная кислота. При гидролизе жирных гидроксикислот образуются лактоны, привносящие в хлебобулочные изделия желательные ароматические ноты (кокосовые или персиковые), но при хранении сгущенного молока они приводят к его порче. Из β-кетокислот путем нагревания после гидролиза образуются метилкетоны, участвующие аналогично лактонам в формировании аромата молочных продуктов. В сырах с голубой плесенью, однако, эти метилкетоны из-за жирнокислотной метаболической активности *Penicillium roqueforti* образуются в гораздо большем количестве, чем в результате превращения кетокислот, присутствующих в ацилглицеринах в связанном состоянии.

Хотя гидролиз жиров, за исключением молочного жира, в целом не приводит к образованию выраженного аромата, считается, что животные жиры некоторым сложным образом участвуют в формировании видоспецифичного запаха мяса. Роль липидов в формировании таких видоспецифичных запахов мяса мы рассмотрим далее в разделе 10.6, посвященном мясным и молочным продуктам.

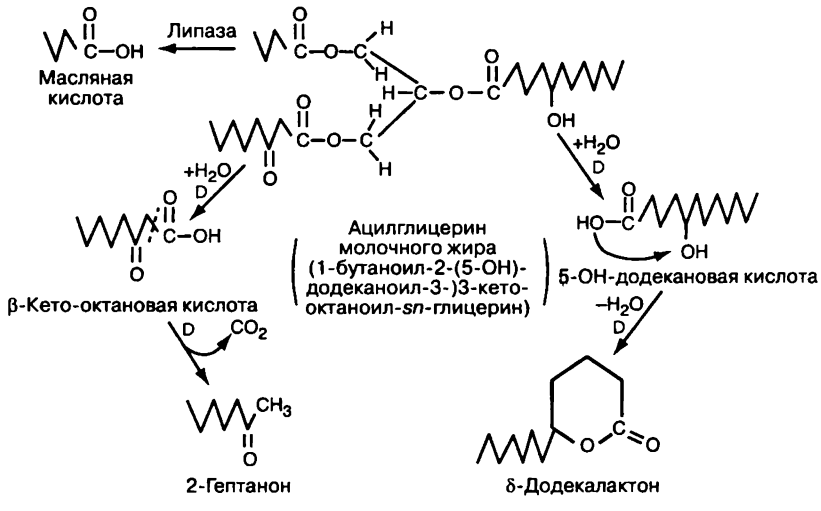


Рис. 10.23. Образование важнейших летучих ароматических соединений из молочного жира вследствие гидролиза ацилглицеринов

10.5.2. Характерные вкусоароматические продукты расщепления высокомолекулярных ПНЖК

Многие считают, что приготовление пищи с использованием животного жира (свиного сала, говяжьего жира и т. п.) позволяет получить существенно отличные и более приятные вкус и аромат, чем с использованием современных кулинарных жиров и растительных масел.

К причинам, обусловливающим образование побочных запахов, относят различный жирнокислотный состав жиров, из-за чего различается профиль окисления ароматических соединений и образуются растворенные в соответствующих жирах разные минорные компоненты. Вместе с тем химические основы этих различий все еще остаются вопросом дискуссионным.

Из пищевых жиров и масел наземных растений в настоящее время выделены только полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) с 18 атомами углерода и менее (главным образом, 18:2-ω6 и 18:3-ω3). В жирах и продуктах животного происхождения подобно растительным жирам и маслам также содержится большое количество ПНЖК, но в них присутствует и значительное количество высокомолекулярной арахидоновой кислоты (20:4-ω6). Благодаря последним исследованиям первичных ароматических продуктов окисления арахидоновой кислоты [10] были получены данные, позволяющие прояснить важнейшие различия в ароматической химии жиров растительного и животного происхождения. При окислении чистой арахидоновой кислоты выделяются характерный, иногда неприятный запах, подобный запаху сырого мяса, обусловленный в основном (*E,Z,Z*)-2,4,7-тридекатриеналем, запах которого похож на запах сырых яиц и сырого мяса птицы (рис. 10.24). Поскольку этот ненасыщенный продукт окисления арахидоновой кислоты имеет сильный выраженный запах, он может служить характеристическим соединением, объясняющим тот факт, что многие разновидности белого мяса имеют вкус, очень похожий на вкус цыпленка.

В животных жирах содержатся также ω3 высокомолекулярные ПНЖК, хотя и в заметно меньшем количестве, чем арахидоновая кислота, однако в рыбьем жире они присутствуют в относительно высоких количествах. В их состав входят докозагексаеновая (ДГК, ω3 $C_{22:6}$) и эйкозапентаеновая (ЭПК; ω3 $C_{20:5}$) кислоты, окисление которых дает среди прочих продуктов окисления (*E,Z,Z*)-2,4,7-декатриеналь, обладающий сильным запахом и привкусом окислившегося рыбьего жира или несвежей рыбы (см. рис. 10.24). В очень высоких концентрациях (*E,Z,Z*)-2,4,7-декатриеналь является причиной образования нежелательных привкуса и запаха рыбы, но в приемлемых концентрациях он придает рыбе и морепродуктам желаемые характерные ароматические свойства. Тем самым продукты окисления ω3 высокомолекулярных ПНЖК дают химическую основу для установления различий между вкусоароматическими компонентами пищевых продуктов из мяса водных и наземных животных. Вместе с тем существует вероятность, что ω3 высокомолекулярные ПНЖК участвуют также в формировании вкусоароматических различий между растительными и животными жирами. С учетом возможностей промышленного разведения водорослей и генной инженерии можно полагать, что традиционные отличительные вкусоароматические особенности растительных и животных жиров довольно скоро станут незаметными.

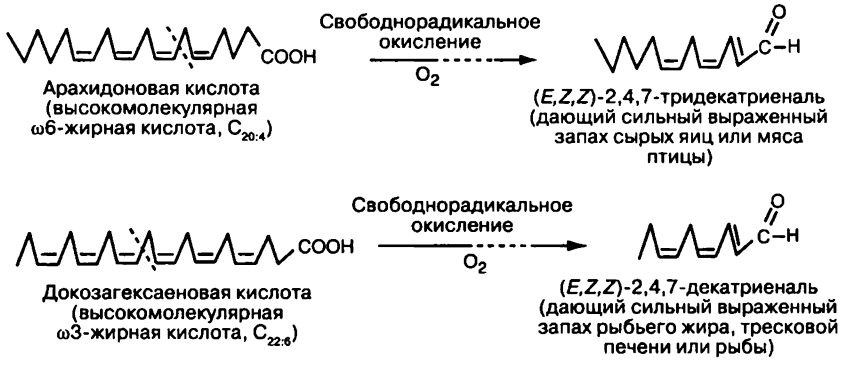


Рис. 10.24. Образование характерных летучих ароматических соединений из высокомолекулярных ПНЖК

10.6. Ароматические летучие соединения молока и мясных продуктов

Несмотря на то что ароматическим соединениям мяса посвящено много исследований, информации о сути характерных отличий вкуса и запаха мяса различных видов животных довольно мало [17, 68] в отличие от данных по ароматическим веществам, участвующим в формировании аромата приготовленного мяса. Определение характерных ароматических свойства мяса независимо от вида животного имеют большую ценность для пищевой промышленности и индустрии вкусоароматических веществ, но в последнее время большие усилия направлены и на установление химических свойств ароматических веществ, обусловленных видовой принадлежностью животных. Подробнее о химических аспектах аромата приготовленного мяса см. раздел 10.7.

10.6.1. Видоспецифичные ароматические соединения мяса и молока жвачных животных

Характерные ароматические соединения некоторых видов мяса неотделимы от жировой фракции. Долгое время этот вопрос являлся дискуссионным, однако начало достижениям в определении ароматических веществ, обусловленных видовой принадлежностью животного, было положено работой [88], посвященной исследованию ароматических веществ баранины, полученной от молодых и взрослых животных. Было показано, что присущий баранине сладковатый аромат обусловлен некоторыми летучими жирными кислотами со средней длиной цепи, особенно имеющими разветвленную цепь с метиловыми остатками. Образование одной из таких важных жирных кислот с разветвленной цепью в баранине от молодых и взрослых животных (4-метилоктановой кислоты) показано на рис. 10.25.

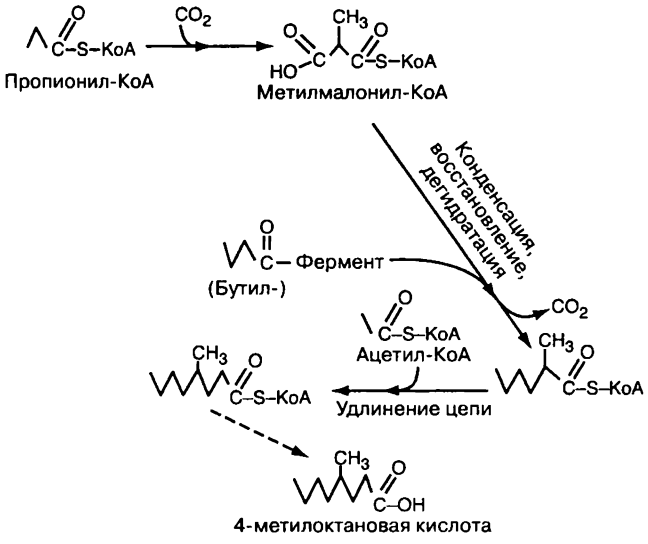


Рис. 10.25. Реакции биосинтеза жирных кислот, имеющих среднюю длину разветвленной цепи с метиловыми остатками, в рубце

При брожении в рубце жвачных животных образуются ацетат, пропионат и бутират; биосинтез большинства жирных кислот ведется из ацетата, в результате чего получаются прямые неразветвленные цепи. Вместе с тем благодаря присутствию пропионата регулярно происходит некоторое ветвление через метиловые остатки, причем при повышении концентрации пропионата в рубце под действием пищеварительных и других факторов наблюдается более значительное метиловое ветвление [73]. В формирование ароматов, обусловленных видовой принадлежностью животных, в том числе в образование 4-метилнонановой кислоты в баранине от молодых и взрослых животных, существенный вклад вносят жирные кислоты со средней длиной цепи и метиловыми остатками. Кроме того, для передачи характерного «козлиного» запаха мясу и молочным продуктам важна 4-этилоктановая кислота (порог ее обнаружения в водном растворе составляет 1,8 мкг/л). Она образуется в тех случаях, когда начальной жирной кислотой является масляная (бутирил-КоА), а не пропионовая кислота (пропионил-КоА), которая связывается с бутиловой функциональной группой фермента (см. рис. 10.25) [29–31].

В образовании характерных ароматов говядины и баранины, обусловленных видом животного, в мясных и молочных продуктах участвуют некоторые алкилфенолы (изомеры метилфенола, этилфенола, *n*-пропила, изопропилфенола и метил-изопропилфенола) [31, 32, 48]. Кроме того, некоторые алкилфенолы (особенно, *m*-замещенные) проявляют кокумиподобные вкусоароматические свойства (см. раздел 10.2.6). В мясе и молоке эти алкилфенолы присутствуют в виде свободных соединений (ароматических) и конъюгатов (без запаха). Они образуются при брожении в рубце веществ из кормов по пути метаболизма шикимовой кислоты (рис. 10.26). Сульфатный, фосфатный и глюкуронидный конъюгаты алкилфенолов у жвачных животных образуются *in vivo*, повышая растворимость алкилфенолов в воде и их выделение с мочой. Впоследствии в ходе ферментативного и термического гидролиза алкилфенолы высвобождаются из конъюгатов и усиливают аромат при ферментированиии и кулинарной обработке молочных и мясных продуктов.

10.6.2. Видоспецифичные ароматические соединения мяса нежвачных животных

Видоспецифичные аспекты ароматической химии мяса нежвачных животных до конца не ясны. Особый привкус, характерный для свиного жира, шкварок и несколько менее выраженный у свинины, частично

обусловлен *p*-крезолом и изовалериановой кислотой, образующимися в результате превращений соответствующих аминокислот микроорганизмами нижнего отдела кишечника свиньи [29, 31]. Аналогичным образом усиливать неприятный «свиной» запах свинины может образование индола и скатола из триптофана. Этот «свиной» запах также усугубляет повышенное содержание (*E,Z,Z*)-2,4,7-тридекатриеналя в результате окисления арахидоновой кислоты (см. раздел 10.5.2), однако для вкуса и аромата свинины желательны приемлемые концентрации этого соединения (см. раздел 10.1.3). Кроме того, показано, что в свинине в умеренных количествах присутствуют γ-лактоны C_5, C_9 и C_{12} [17], которые могут способствовать формированию у свинины сладковатого привкуса.

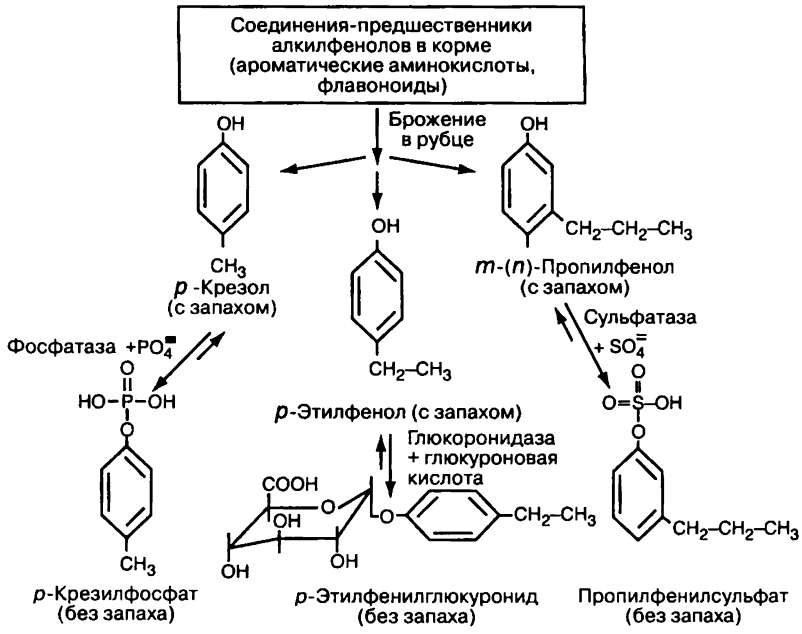


Рис. 10.26. Образование алкилфенолов из кормов в рубце жвачных животных

Большое внимание уделяется ароматическим соединениям, определяющим половую принадлежность свиньи и обусловливающим появление в свинине сильных посторонних привкусов. Это прежде всего относится к 5-α-андрост-16-ен-3-ону с запахом розоловой кислоты (аурина, мочи) и 5-α-андрост-16-ен-3α-олу с мускусным запахом (рис. 10.27) [25]). Эти соединения с запахом половой принадлежности («кабаньим») встречаются главным образом у хряков, но могут присутствовать и у боровов, и у самок. Данные стероидные соединения воспринимаются некоторыми людьми (особенно женщинами) как особо неприятные, хотя многие к ним генетически невосприимчивы. Относительно недавно было обнаружено, что соединения, ответственные за этот «кабаний» запах, вызывают посторонний привкус и в свинине.

Активно изучались также характерные вкус и запах мяса птицы, при этом в курином мясе образование характерных вкусоароматических соединений обусловлено окислением липидов. В работе [33] было показано, что характерный вкус и аромат вареного куриного мяса создается карбонилами, *c*-4-деценалем, *t*-2-*c*-5-ундекадиеналем и *t*-2-*c*-4-*t*-7-тридекатриеналем (предполагалось, что эти соединения являются производными линолевой и арахидоновой кислот). Более позднее исследование летучих продуктов самоокисления арахидоновой кислоты (см. раздел 10.5.2) показало, что (*E,Z,Z*)-2,4,7-тридекатриеналь, образующийся в ходе этой реакции, является веществом с сильным запахом мяса птицы, и таким образом, является соединением, ха-

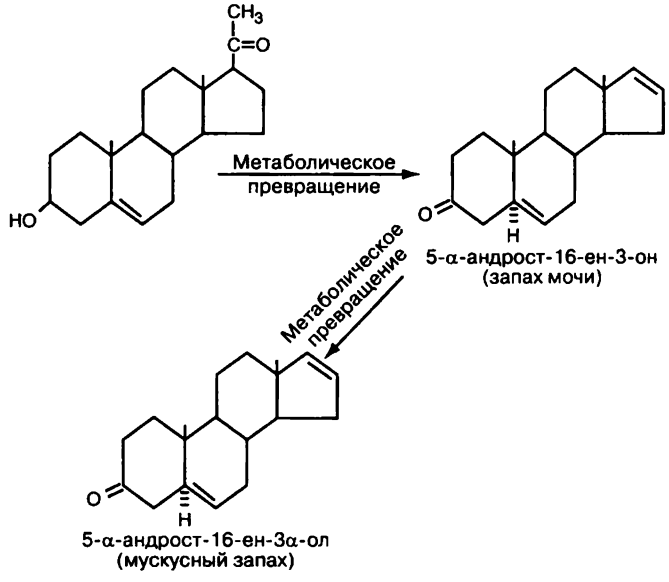


Рис. 10.27. Образование стероидных соединений, обусловливающих посторонний мускусный запах (порок свинины из-за присутствия «кабаньего» запаха)

рактеристическим для вкуса и аромата куриного и других видов белого мяса [10]. На характеристики вкуса и аромата также влияют и другие факторы, в том числе способ кулинарной обработки, однако важно то, что в курином мясе накапливается α-токоферол (антиоксидант), отсутствующий в мясе индейки. В ходе кулинарной обработки, особенно при жарке, в мясе индейки образуется больше карбонилов, чем в курином мясе.

10.6.3. Летучие соединения в рыбо- и морепродуктах

Ароматические вещества в рыбо- и морепродуктах имеют больше вкусоароматических особенностей, чем ароматические вещества мясных продуктрв. Причинами различных вкуса и запахов являются большее видовое разнообразие животных (рыба дикая и искусственного разведения, моллюски и ракообразные), а также изменчивость вкуса и аромата в зависимости от степени свежести. Поскольку вкус и запах свежих рыбо- и морепродуктов зачастую существенно ослабляются или вообще утрачиваются при хранении замороженных и переработанных продуктов в системах дистрибьюции, многие потребители связывают развитие «тяжелого» рыбного запаха со всеми рыбо- и морепродуктами. Вместе с тем свежие морепродукты имеют нежный вкус и запах, совершенно отличные от проявляющихся в «свежих» рыбо- и морепродуктах при реализации. Одним из способствующих этому факторов является накопление и последующее снижение содержания в мышечных тканях умами-соединения (инозин-5'-монофосфата, см. раздел 10.2.5), что приводит к существенным изменениям вкуса и запаха охлажденных рыбо- и морепродуктов со временем.

Первоначально характерные приятный запах и вкус свежей рыбы обеспечивает группа C_6-, C_8- и C_9-альдегидов, кетонов и спиртов, образующихся под действием липоксигеназы [47]. В целом вкусоароматические соединения в рыбо- и морепродуктах подобны образующимся под действием липоксигеназ в растениях (см. раздел 10.3.5), однако липоксигеназы рыбы и морепродуктов участвуют в реакциях ферментативного окисления при синтезе лейкотриенов, так что вкусоароматические соединения являются побочным продуктом этих реакций. Например, реакции перекисного окисления с последующим диспропорционированием приводят сначала к образованию спирта, а затем соответствующего карбонила (рис. 10.28) [75]. Эти соединения придают запаху свежей рыбы оттенки дынного аромата и зелени, участвуя в формировании нежного вкуса свежей приготовленной рыбы (как непосредственно, так и в качестве реагентов в ходе образования новых вкусоароматических соединений в ходе кулинарной обработки).

Во вкусе и запахе ракообразных и моллюсков помимо летучих веществ большую роль играют нелетучие вкусовые вещества. Так, вкус приготовленного мяса снежного краба можно почти полностью имитировать с помощью смеси из 12 аминокислот, нуклеотидов и ионов солей [41]. Хорошую имитацию вкусоароматических компонентов мяса краба можно приготовить из этих вкусовых веществ, а также некоторого количества карбонилов и триметиламина. Триметиламин уже давно ассоциируют с рыбным и крабовым запахами (ему свойственен аммиачный рыбный запах). Триметиламин и диметиламин образуются путем эндогенного или микробиологического ферментативного расщепления триметиламиноксида (рис. 10.29), который присутствует в значительных количествах только в морской рыбе и в морепродуктах (у морской рыбы триметиламиноксид является компонентом осмотической системы) [36]. Поскольку в только что выловленной рыбе триметиламина практически нет, это соединение модифицируется и участвует в образовании запаха тухлой рыбы, усиливая запахи, характерные для рыбоперерабатывающего цеха. Образование диметиламина чаще всего связывают с хранением рыбы в замороженном состоянии. Считается, что формальдегид, образующийся одновременно с диметиламином, способствует образованию поперечных сшивок между молекулами белка и тем самым участвует в затвердении мышечной ткани рыб при хранении в замороженном состоянии.

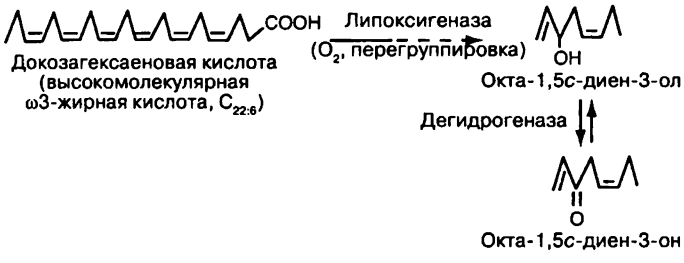


Рис. 10.28. Ферментативное образование летучих ароматических соединений в свежей рыбе из высокомолекулярной ω3 ненасыщенной жирной кислоты

Прочие запахи и вкусы рыбопродуктов зачастую описывают такими терминами, как «тухлый» и «похожий на рыбий жир». Эти вкусоароматические ощущения обусловле-

ны конкретными карбонильными соединениями, образующимися в результате самоокисления ω3 высокомолекулярных ПНЖК (см. раздел 10.5.2). Характерный рыбный вкус и аромат придает (*E,Z,Z*)-2,4,7-декатриеналь (см. рис. 10.24), а *c*-4-гептеналь его усиливает [47].

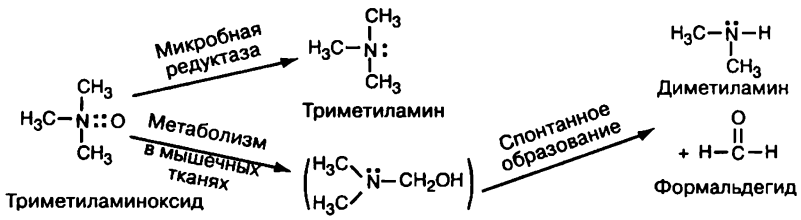


Рис. 10.29. Образование основных летучих аминов в мышечных тканях морских видов рыб

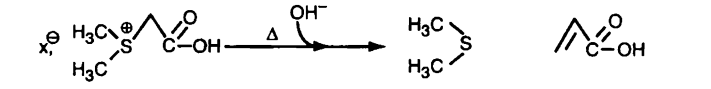


Рис. 10.30. Образование диметилсульфида в морепродуктах

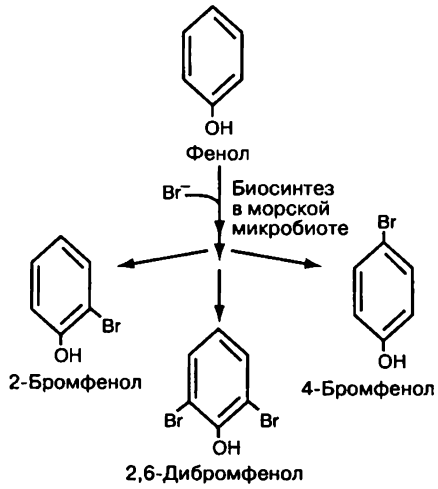


Рис. 10.31. Образование бромфенолов в морепродуктах

Некоторые характерные для рыбо- и морепродуктов вкусоароматические вещества образуются из веществ окружающей среды (в основном через природную пищевую цепь объектов промысла). Так, характерный вкус и аромат съедобных моллюсков и устриц придает диметилсульфид, образующийся в основном при термическом расщеплении диметил-β-пропиотетина (рис. 10.30), который содержится в морской микробиоте, служащей пищей для моллюсков и устриц [56].

На вкус и аромат искусственно выращиваемых креветок и лосося влияет их кормовой рацион, существенно отличающийся от рациона диких экземпляров [56]. Одно из основных различий в соответствующих вкусоароматических компонентах здесь обусловлено недостатком бромфенолов в кормовом рационе аквакультуры. Бромфенолы образуются метаболически (рис. 10.31) в самых разных низших формах морских микроорганизмов и передаются вверх по пищевой цепи, где они придают рыбо- и морепродуктам их характерный вкус и аромат [13]. Один из наиболее известных ароматических эффектов бромфенолов встречается у вылавливаемых диких креветок, запах которых варьирует от едва заметного морского до отчетливого йодного. С другой стороны, очень низкое содержание бромфенолов у креветок из аквакультуры дает неотчетливый или слабый запах, в котором отсутствуют традиционные морские ноты.

10.7. Образование ароматических летучих соединений при химических реакциях в ходе переработки

Многие ароматические соединения, выявляемые в переработанных пищевых продуктах или после их кулинарной обработки, образуются в результате химических реакций, общих для всех типов пищевых продуктов независимо от их происхождения (животного, растительного или микробиологического). Эти реакции происходят в присутствии соответствующих реагентов и при наличии определенных условий (температуры, значения pH, света и др.). Мы специально посвящаем самостоятельный раздел образованию ароматических соединений в результате химических реакций при переработке из-за их важности для всех типов пищевых продуктов и большой роли в составе натуральных вкусоароматических концентратов,

широко применяемых в производстве пищевых продуктах (особенно при желательности мясного или пикантного вкуса или аромата). См. также главы 3 (углеводы), 4 (липиды) и 7 (витамины).

10.7.1. Вкусоароматические вещества тепловой обработки

Традиционно эти вкусоароматические вещества считались продуктами реакций неферментативного потемнения с участием редуцирующих сахаров и аминных соединений, то есть процессов образования бурых пигментов (о реакциях Майяра см. главы 3 и 4). Хотя в образовании таких ароматических соединений в пищевых продуктах почти всегда участвуют реакции Майяра, в этом процессе важно также взаимовлияние реакций потемнения и других компонентов пищевых продуктов. При таком более широком подходе могут учитываться и вышеупомянутые взаимодействия, и реакции, происходящие после тепловой обработки.

Хотя многие образующиеся при тепловой обработке соединения обладают сильным приятным ароматом, действительно характерный вкусоароматический эффект дают относительно небольшое количество соединений. Вместо него зачастую привносятся ароматические ноты общего характера — ореховая, мясная, жареная, хлебной корочки, жженки, цветочная, растительная или карамельная. Некоторые такие ароматические соединения являются ациклическими, но многие из них — это гетероциклы с азотными, серными или кислородными заместителями (рис. 10.32). Такие соединения встречаются во многих переработанных пищевых продуктах и напитках — в жареном и вареном мясе, кофе, обжаренных орехах, пиве, хлебобулочных и мучных кондитерских изделиях, снеках, какао-продуктах и др. Их распространенность зависит от наличия соединений-предшественников, температуры, времени и значения активности воды.

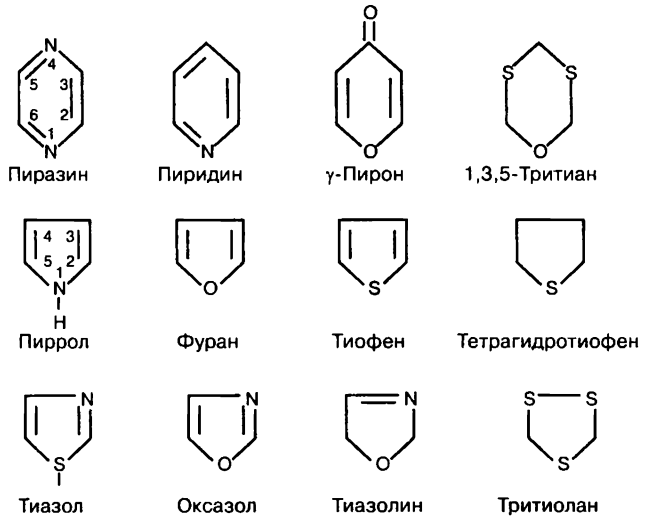


Рис. 10.32. Гетероциклические структуры молекул вкусоароматических соединений, образующихся при тепловой обработке или в ходе реакций Майяра

Производство вкусоароматических концентратов осуществляется путем подбора реакционных смесей и технологических условий, имитирующих ход реакций при традиционных пищевых технологиях. Подобранные ингредиенты (табл. 10.5), в число которых обычно входят редуцирующий сахар, аминокислоты и серосодержащие соединения, подвергают обработке при повышенных температурах с образованием характерного вкусоароматического профиля [35]. Распространенным ингредиентом является тиамин, у которого атомы азота и серы уже имеются в составе кольца (см. главу 7).

Из-за большого количества вкусоароматических соединений, образующихся при переработке пищевых продуктов, мы не можем полностью изложить все химические аспекты их образования. Мы приведем лишь примеры некоторых наиболее важных ароматических летучих соединений и рассмотрим механизм их образования.

К важнейшим источникам аромата всех жареных, обжаренных или аналогичным образом термообработанных пищевых продуктов относятся алкилпиразины. Самый прямой путь их образования — это взаимодействия α-дикарбонильных соединений (промежуточных продуктов реакций Майяра) с аминокислотами путем расщепления Штрекера (рис. 10.33). Перенос аминогруппы на дикарбонил дает возможность интеграции аминокислотного азота в небольшие соединения, участвующие в реакции конденсации. Аминокислотой, участвующей в расщеплении Штрекера, выбран метионин, как так в нем содержится атом серы, позволяющий образоваться метионалю — соединению, обусловливающему характерный аромат вареного картофеля и сырных крекеров. Кроме того, метиональ легко далее разлагается с образованием метилмеркаптана, который окисляется до диметилдисульфида, что обеспечивает источник реакционноспособных низкомолекулярных серосодержащих соединений, участвующих в общей системе развития аромата.

Таблица 10.5

Некоторые распространенные ингредиенты для получения вкусоароматических соединений, обусловливающих мясной вкус и запах

Ингредиент	Вкусоароматическое соединение
Гидролизованный растительный белок	Тиамин
Автолизат дрожжей	Цистеин
Говяжий экстракт	Глютатион
Специальные животные жиры	Глюкоза
Яичный порошок	Арабиноза
Глицерин	5'-Рибонуклеотиды
Глютамат натрия	Метионин

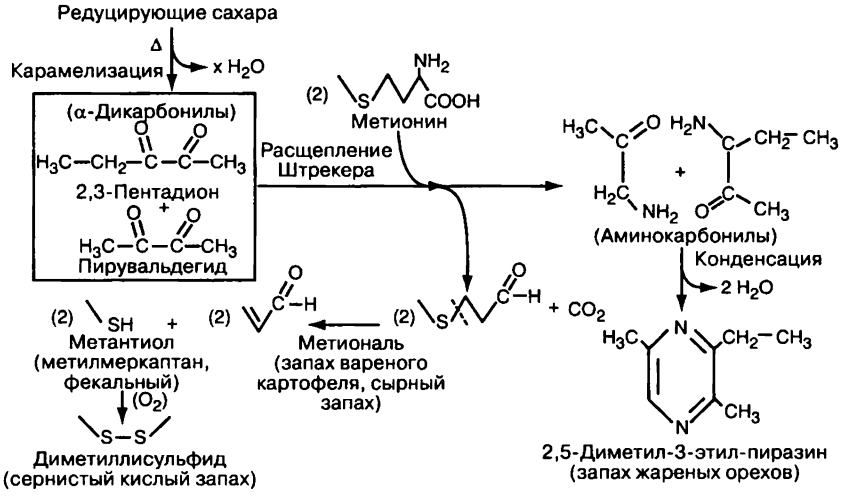


Рис. 10.33. Образование алкилпиразина и небольших серосодержащих соединений в реакциях образования ароматических веществ

Наиболее реакционноспособными соединениями в смесях для технологических ароматизаторов являются сероводород и аммиак, которые часто включают в модельные системы для стимулирования определенных механизмов реакции. Термическое расщепление цистеина (рис. 10.34) приводит к образованию аммония, сероводорода и ацетальдегида. При последующей реакции ацетальдегида с меркаптопроизвод-

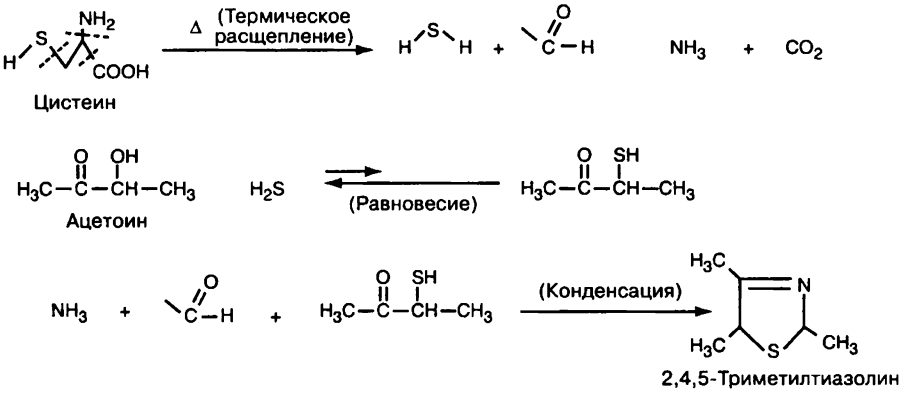
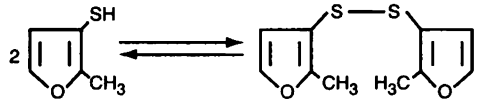


Рис. 10.34 Образование тиазолина, дающего запах вареной говядины, в ходе реакции фрагментов цистеина и промежуточных соединений реакции Майяра

ным ацетоина (из реакции Майяра) образуется тиазолин, который участвует в формировании запаха вареной говядины [57].

Некоторые гетероциклические вкусоароматические соединения достаточно химически активны и распадаются или взаимодействуют с другими компонентами пищевых продуктов или реакционных смесей. Пример обеспечения стабильности аромата в пищевых продуктах дают соединения, приведенные в уравнении (10.2), оба из которых дают отчетливые, но разные мясные ароматы [20]. Аромат жареного мяса обусловлен 2-метил-3-фурантиолом (в восстановленной форме), но при окислении до дисульфида этот аромат превращается в характерный и стабильный запах полностью приготовленного мяса. Подобные химические реакции обусловливают тонкие изменения аромата мяса в результате изменения степени жесткости кулинарной обработки и времени после приготовления. При технологической обработке сложных систем сера (свободная, в виде тиолов или полисульфидов) может включаться в различные соединения с образованием новых ароматических компонентов. Вместе с тем, даже несмотря на то что диметилсульфид часто встречается в переработанных пищевых продуктах, он вступает в реакцию нелегко. В пищевых продуктах растительного происхождения диметилсульфид образуется из биосинтезированных молекул, особенно из солей S-метилметионинсульфония (рис. 10.35), которые недостаточно термостойки, и в процессе кулинарной обработки диметилсульфид легко высвобождается. Диметилсульфид придает характерные запахи свежесваренной и консервированной сладкой кукурузе, а также томатному соку и другим термообработанным томатным продуктам.



2-Метил-3-фурантиол (2-метил-3-фурил)-*бис*-дисульфид (10.2)

Некоторые из наиболее приятных ароматов, образующихся при технологических реакциях, обусловлены соединениями, приведенными на рис. 10.36. Эти соединения дают карамельные ароматы и выявлены во многих переработанных пищевых продуктах. Циклотен, например, широко применяется в синтезе ароматизатора «кленовый сироп», а мальтол — как усилитель вкуса для сладких пищевых продуктов и напитков (см. раздел 10.2.6). 4-Гидрокси-2,5-диметил-3(2H)-фуранон (фуранеол) иногда называют «ананасовый компаунд», так как впервые он был выделен из переработанного ананаса, в характерном аромате которого он играет важную роль. Фуранеол также биосинтезируется, привнося ноту спелой клубники, характерную для свежесобранных ягод. 3-Гидрокси-4,5-диметил-2,5-дигидрофуран-2-он иногда называют «сахарным фураноном», так как его характерный аромат легко выявляется в газовой среде над сахарозой. Кроме того, фураноны обнаруживаются в вареном мясе, где они усиливают мясной вкус и запах.

Структура этих соединений (либо в форме расположенного в одной плоскости енола, либо в форме циклического кетона) обычно обусловлена предшественниками сахаров, и этот структурный компонент,

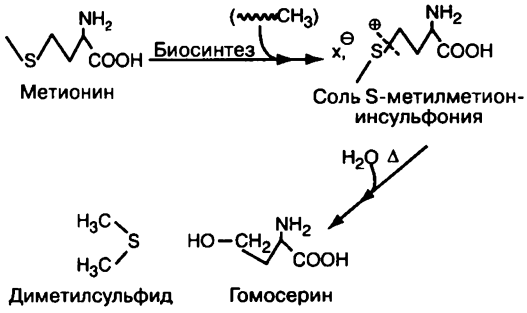


Рис. 10.35. Образование диметилсульфида при термическом расщеплении солей S-метилметионинсульфония

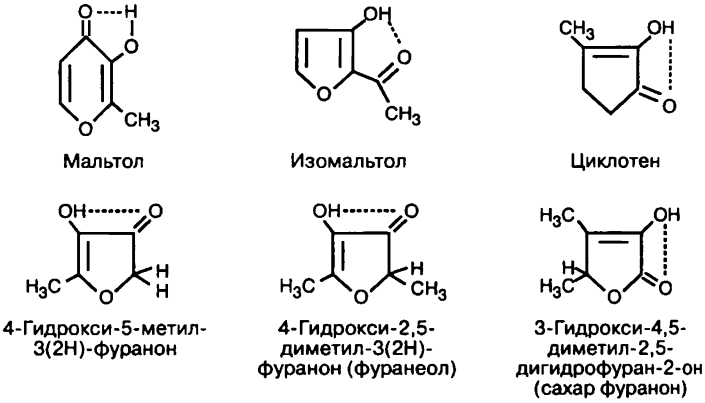
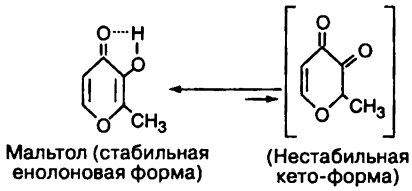


Рис. 10.36. Упрощенные структурные формулы некоторых важных карамельных ароматических соединений, образующихся при технологической обработке пищевых продуктов

по-видимому, отвечает за их карамельный аромат [61]. Как показано в уравнении (10.3) для мальтола, плоскостная форма енолона более предпочтительна, чем форма циклического кетона, так как форма енолона допускает сильное межмолекулярное водородное связывание.



(10.3)

Вкусус и аромату шоколада и какао-продуктов уделяется большое внимания из-за высокого спроса на их ароматические вещества. После сбора урожая какао-бобы зачастую ферментируют в недостаточно контролируемых условиях. Эти бобы затем обжаривают, иногда с промежуточной щелочной обработкой, придающей какао-бобам более темный оттенок и смягчающей их аромат. При ферментации происходит гидролиз сахарозы до редуцирующих сахаров, высвобождаются аминокислоты и окисляются некоторые полифенолы. При обжарке какао-бобов образуется большое число пиразинов и других гетероциклических соединений, однако уникальный аромат какао обусловлен взаимодействием альдегидов из реакции расщепления Штрекера. На рис. 10.37 приведена важная ароматобразующая реакция между фенилацетальдегидом (из фенилаланина) и 3-метилбутаналем (из лейцина). Продукт этой альдольной конденсации, 5-метил-2-фенил-2-гексеналь, дает стойкий характерный шоколадный аромат. Данный пример также показывает, что химические реакции при образовании технологических ароматизаторов не всегда дают гетероциклические соединения.

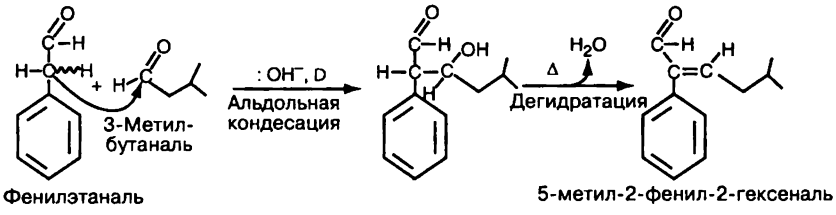


Рис. 10.37. Образование характерного аромата какао при альдольной конденсации двух альдегидов, образующихся в результате расщепления Штрекера

10.7.2. Образование летучих соединений при окислительном расщеплении каротиноидов

Процессы окисления триацилглицеринов и жирных кислот мы уже рассматривали в предыдущих разделах, но не затрагивали некоторые важные вкусоароматические соединения, образующиеся при окислении предшественников каротиноидов. Для некоторых таких реакций необходим синглетный кислород, образующийся путем сенсибилизации хлорофилла, а другие связаны с процессами фотоокисления. Большинство ароматических соединений, образующихся в результате окисления каротиноидов (или изопреноидов) было идентифицировано при томлении табака [18], и многие из них считаются характеристическими для аромата табака. В настоящее время важным в качестве пищевого ароматизатора считается относительно небольшое количество соединений этой категории (три из них приведены на рис. 10.38). Каждое из этих соединений обладает уникальными сладкими, цветочными и фруктовыми ароматическими нотами, сила которых обусловлена концентрацией. Они хорошо сочетаются с ароматом пищевых продуктов и дают тонкие эффекты, как желаемые, так и нежелательные. Например, β-дамасценон положительно влияет на аромат свежего яблока. Он также усиливает аромат вин, но в пиве это соединение в концентрации всего лишь несколько мкг/л дает ноту затхлости и изюма. β-Ионон дает приятный фиалковый цветочный аромат, хорошо совместимый с другими фруктовыми ароматами, но он также является основным соединением, обусловливающим посторонний привкус окисленной лиофилизированной моркови. Эти соединения

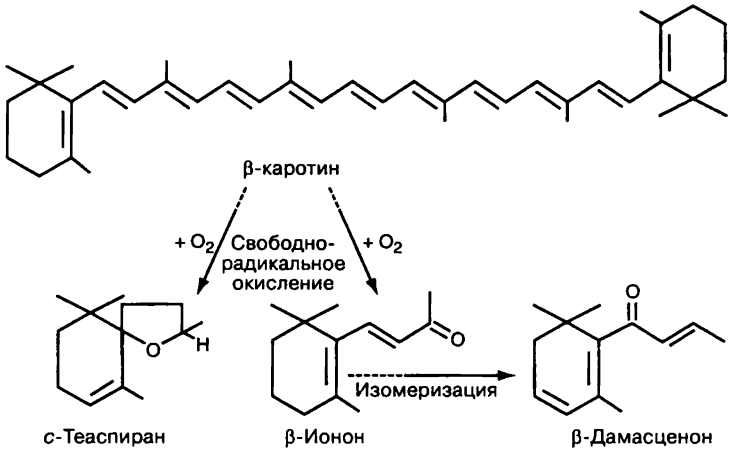


Рис. 10.38. Образование некоторых ароматических соединений чая путем окислительного расщепления каротиноидов

выявлены также в черном чае, где они положительно влияют на его аромат. Теаспиран и родственные ему производные способствуют образованию сладких фруктовых и землистых нот в чайном аромате. Обычно они присутствуют в низких концентрациях, но эти и родственные им соединения широко распространены, так что вполне вероятно, что они обусловливают гармоничность аромата многих пищевых продуктов.

10.8. Перспективы химии и технологии вкусоароматических соединений

В последние 50 лет лет с развитием и увеличением доступности приборного оснащения для ВЭЖХ и масс-спектрометрии быстрого сканирования началось бурное развитие современной химии и технологии вкусоароматических веществ [78]. Были последовательно открыты ароматически активные соединения, и сконцентрированные усилия в этой области в значительной степени позволили выполнить поставленные цели. Появилась обширная база знаний по механизмам химических реакций, вовлеченных в образование и расщепление вкусоароматических соединений, но многие детали этих процессов до сих пор остаются не до конца ясными и требуют дальнейшего изучения. Прогресс в области генной инженерии для достижения специфических ароматических эффектов в различных одноклеточных и высших организмах обеспечивает мотивацию для понимания всей сложности механизмов биосинтеза веществ, связанных с формированием и развитием вкуса и аромата.

Вместе с тем вполне вероятно, что основное направление будущих исследований в области химии ароматических веществ придется существенно сместить в целях удовлетворения неотложных нужд пищевой промышленности. Широкое распространение нутрицевтиков и функциональных пищевых продуктов несет с собой новые проблемы, связанные с маскировкой или нейтрализацией нежелательных привкусов или запахов, присущих ингредиентам с функциональными свойствами. Сложные проблемы связаны также с переработкой рецептур в целях выпуска более полезных для здоровья пищевых продуктов с пониженным содержанием соли, жиров и очищенных углеводов. Первые попытки разработки пищевых продуктов, соответствующих оптимальным требованиям по пищевой ценности, были неудачными, но пищевая промышленность вполне может преодолеть эти трудности.

Современные исследования в области химии аромата, в частности, анализ скорости высвобождения отдельных вкусоароматических химических соединений из различных пищевых матриксов, были направлены на понимание и решение проблем создания высококачественного вкуса и аромата пищевых продуктов с измененной рецептурой, состав которых был радикально изменен в целях удовлетворения нутритивных требований (например, по исключению жира и т. п.). Тем не менее, до сих пор новых открытий в области высвобождения ароматических соединений не появилось, что свидетельствует о необходимости приме-

нения иных подходов. Одним из наиболее недооцененных направлений в этом отношении являются исследования усилителей и модификаторов вкуса и аромата (см. раздел 10.2.6), роль которых во вкусе пищи еще не до конца определена и не вполне понятна. Подобные исследования, однако, потребуют изменений в традиционном химическом мышлении пищевиков и специалистов по вкусоароматическим соединениям. Кроме того, потребуются изменения в методах органолептического анализа, позволяющих специфически обнаруживать и оценивать тонкие особенности вкусовой привлекательности пищевых продуктов, обеспечиваемой модификаторами вкуса и аромата.

Дополнительная литература

Amerine M. A., Pangborn R. M., Roessler E. B. *Principles of Sensory Evaluation of Food* — NY: Academic Press, 1965.

Beets M. G. J. Structure-Activity Relationships in Human Chemoreception. — London: Applied Science Publishers, 1978.

Burdock G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients.* — 5th ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.

Fazzalari F. A. (ed.). *Compilation of Odor and Taste Threshold Values Data.* — Philadelphia, PA: American Society for Testing Materials, 1978.

Ho C. T., Hartman T. G. (eds) (1994). *Lipids in Food Flavors,* ACS Symposium Series 558, American Chemical Society, Washington, D.C.

Maarse H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. — NY: Marcel Dekker, 1991.

Morton I. D., Macleaod A. J. (eds). *Food Flavors* (Part A, Introduction). — NY: Elsevier Scientific, 1982.

O'Mahony M.. Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures. — NY: Marcel Dekker, 1986.

Parliment T. H., Morello M. J., McGorrin R. J. *Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave, and Extrusion Processes.* — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1994. — (ACS Symposium Series 543)

Rouseff R. L. (ed.). *Bitterness in Foods and Beverages.* — Amsterdam: Elsevier, 1990.

Shahidi F. (ed.). *Flavor of Meat and Meat Products.* — London: Blackie Academic & Professional, 1994.

Stone H., Sidel J. L. *Sensory Evaluation Practices.* — NY: Academic Press, 1985.

Teranishi R., Takeoka G. R., Guntert M. (eds). *Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions.* — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1992. — (ACS Symposium Series 490).

Литература

1. Amerine M. A., Pangborn R. M., Roessler E. B. *Principles of Sensory Evaluation of Food* — NY: Academic Press, 1965. — P. 106.
2. ASTM Manual on Sensory Testing Methods, STP 434. — Philadelphia, PA: American Society for Testing Materials, 1968.
3. Bartoshuk L. M.. Sensory analysis in the taste of NaCl // *Biological and Behaviorial Aspects of Salt Intake* / R. H. Cagan, M. R. Kare (eds). — NY: Academic Press, 1980. — P. 83–96.
4. Bartoshuk L. M., Fast K., Snyder D., Duffy V. B. Genetic differences in human oral perception // *Genetic Variation in Taste Sensitivity* / J. Prescott, B. J. Tepper (eds). — NY: Marcel Dekker, 2004. — P. 1–41.
5. Beets M. G. J. The sweet and bitter modalities // *Structure-Activity Relationships in Human Chemoreception.* — London: Applied Science Publishers, 1978. — P. 259–303.
6. Beets M. G. J. The sour and salty modalities // *Structure-Activity Relationships in Human Chemoreception.* — London: Applied Science Publishers, 1978. — P. 348–362.
7. Belitz H. D., Wieser H. Bitter compounds: occurrence and structure-activity relationships // *Food Rev. Intl.,* 1985, 1, p. 271–354.
8. Birch G. G. Basic tastes of sugar molecules // *Criteria of Food Acceptance* / J. Solms, R. L. Hall (eds). — Zurich: Forster Verlag, 1981. — P. 282–291.
9. Birch G. G., Lee C. K., Ray A. The chemical basis of bitterness in sugar derivatives // *Sensory Properties of Foods* / G. G. Birch, J. G. Brennan, K. J. Parker (eds). — London: Applied Science Publishers, 1978. — P. 101–111.
10. Blank I., Lin J., Vera F. A. Welti D. H., Fay L. B. Identification of potent odorants formed by autoxidation of arachidonic acid: structure elucidation and synthesis of (EZZ)-2,4,7-tridecatrienal // *J. Agric. Food Chem.,* 2001, 49, p. 2959–2965.
11. Boelens M. H. Spices and condiments II // *Volatile Compounds in Foods and Beverages* / H. Maarse (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1991. — P. 449–482.
12. Boelens M. H., Boelens H., van Gemert L. J. Sensory properties of optical isomers // *Perfumer Flavorist,* 1993, 18, p. 1–16.
13. Boyle J. L., Lindsay R. C., Stuiber D. A. Occurrence and properties of flavor-related bromophenols found in the marine environment: a review // *J. Aqua. Food Prod. Devel.,* 1993, 2, p. 75–112.
14. Brieskorn C. H. Physiological and therapeutical aspects of bitter compounds // *Bitterness in Foods and Beverages* / R. L. Rouseff (ed.). — Amsterdam: Elsevier, 1990. — P. 15–33.
15. Cliff M., Heymann H. Descriptive analysis of oral pungency // *J. Sens. Studies,* 1992, 7, p. 279–290.
16. DeTaeye L., DeKeukeleire D., Siaeno E., Verzele M. Recent developments in hop chemistry // *European Brewery Convention Proceedings,* European Brewing Congress. — Amsterdam, 1977. — P. 153–156.

17. Dwivedi B. K. Meat flavor // *Crit. Rev. Food Technol.*, 1975, 5, p. 487–535.
18. Enzell C. R. Influence of curing on the formation of tobacco flavour // *Flavour '81* / P. Schreier (ed.). — Berlin: Walter de Grayter, 1981. — P. 449–478.
19. Eriksson C. E. Review of biosynthesis of volatiles in fruits and vegetables since 1975 // *Progress in Flavour Research* / D. G. Land, H. E. Nursten (eds). — London: Applied Science Publishers, 1979. — P. 159–174.
20. Evers W. J., Heinsohn H. H., Mayers B. J., Sanderson A. Furans substituted at the three positions with sulfur // *Phenolic, Sulfur, and Nitrogen Compounds in Food Flavors* / G. Charalambous, I. Katz (eds). — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1976. — P. 184–193.
21. Fazzalari F. A. (ed.) *Compilation of Odor and Taste Threshold Values Data.* — Philadelphia, PA: American Society for Testing Materials, 1978.
22. Forss D. A. Sensory characterization // *Flavor Research, Recent Advances* / R. Teranishi, R. A. Flath, H. Sugisawa (eds). — NY: Marcel Dekker, 1981. — P. 125–174.
23. Forsyth W. G. C. Tannins in solid foods // *The Quality of Foods and Beverages. — Vol. 1. Chemistry and Technology* / G. Charalambous, G. Inglett (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 377–388.
24. Govindarajan V. S. Pungency: the stimuli and their evaluation // *Food Taste Chemistry* / J. C. Boudreau (ed.). — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1979. — P. 52–91.
25. Gower D. B., Hancock M. R., Bannister L. H. Biochemical studies on the boar pheromones, 5α-androst-16-en-3-one and 5α -androst-16-en-3α -ol, and their metabolism by olfactory tissue // *Biochemistry of Taste and Olfaction* / R. H. Cagan, M. R. Kare (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 7–31.
26. Grosch W. Lipid degradation products and flavour // *Food Flavours (Part A, Introduction)* / I. D. Morton, A. J. Macleod (eds). — Amsterdam: Elsevier Scientific, 1982. — P. 325–398.
27. Grosch W. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs) // *Flavour Fragrance J.*, 1994, 9, p. 147–158.
28. Guenther E. *The Essential Oils.* — Vol. 1–6. — NY: van Nostrand, 1948.
29. Ha J. K., Lindsay R. C. Distribution of volatile branched-chain fatty acids in perinephric fats of various red meat species // *Lebensm. Wissen. Tech.*, 1990, 23, S. 433–439.
30. Ha J. K., Lindsay R. C. Contributions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses // *J. Dairy Sci.*, 1991, 74, p. 3267–3274.
31. Ha J. K., Lindsay R. C. Volatile alkylphenols and thiophenol in species-related characterizing flavors of red meats // *J. Food Sci.*, 1991, 56, p. 1197–1202.
32. Han L.-H. A. Characterization and Enhancement of Contributions of Alkylphenols to Baked-Butter and Other Flavors: Ph. D. Thesis. — Madison, WI: University of Wisconsin-Madison, 2000. — P. 90–135.
33. Harkes P. D., Begemann W. J. Identification of some previously unknown aldehydes in cooked chicken // *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1974, 51, p. 356–359.
34. Hasegawa S., Patel M. N., Snyder R. C. Reduction of limonin bitterness in navel orange juice serum with bacterial cells immobilized in acrylamide gel // *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30, p. 509–511.
35. Heath H. B. *Source Book of Flavors.* — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1981. — P. 110.
36. Hebard C. E., Flick G. J., Martin R. E. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish // *Chemistry and Biochemistry of Marine Products* / R. E. Martin, G. J. Rick, D. R. Ward (eds). — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1982. — P. 149–304.
37. Hiraide M., Miyazaki Y., Shibata Y. The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, Lentinula edodes. I: relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components // *J. Wood Sci.*, 2004, 50, p. 358–364.
38. Ho C. T., Hartman T. G. (eds). *Lipids in Food Flavors.* — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1994. — P. 1–333.
39. Kawamura Y., Kare M. R. (eds.). *Umami: A Basic Taste.* — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 1–649.
40. Kimball D. A., Norman S. I. Processing effects during commercial debittering of California navel orange juice // *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, p. 1396–1400.
41. Konosu S. The taste of fish and shellfish // *Food Taste Chemistry* / J. C. Boudreau (ed.). — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1979. — P. 203–213.
42. Koppenhoefer B., Behnisch R., Epperlein U., Holzschuh H., Bernreuther R. Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavors and fragrances // *Perfumer Flavorist*, 1994, 19, p. 1–14.
43. Kawamura Y., Kare M. R. (eds). *Umami: A Basic Taste.* — NY: Marcel Dekker, 1987.
44. Kuninaka A. Taste and flavor enhancers // *Flavor Research Recent Advances* / R. Teranishi, Flath R. A., Sugisawa H. (eds). — NY: Marcel Dekker, 1981. — P. 305–353.
45. Laing D. G., Jinks A. Favour perception mechanisms // *Trend Food Sci. Technol.*, 1996, 7, p. 387–389; 421–424.
46. Lee C. B., Lawless H. T. Time-course of astringent sensations // *Chem. Senses*, 1991, 16, p. 225–238.
47. Lindsay R. C. Fish flavors // *Food Rev. Intl.*, 1990, 6, p. 437–455.
48. Lopez V., Lindsay R. C. Metabolic conjugates as precursors for characterizing flavor compounds in ruminant milks // *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, p. 446–454.

49. Maarse H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. — NY: Marcel Dekker, 1991.
50. Martin G., Remaud G., Martin G. J. Isotopic methods for control of natural flavours authenticity // *Flavor Fragrance J.*, 1993, 8, p. 97–107.
51. McGregor R. Taste modification in the biotech era // *Food Technol.*, 2004, 58, p. 24–30.
52. Mielle P. «Electronic noses»: towards the objective instrumental characterization of food aroma // *Trend Food Sci. Technol.*, 1996, 7, p. 432–438.
53. Morgan M. E., Libbey L. M., Scanlan R. A. Identity of the musty-potato aroma compound in milk cultures of *Pseudomonas taetrolens* // *J. Dairy Sci.*, 1972, 55, p. 666.
54. Morton I. D., Macleod A. J. (eds) *Food Flavours (Part A, Introduction).* — Amsterdam: Elsevier Scientific, 1982.
55. Mosandi A. Chirality in flavor chemistry — recent developments in synthesis and analysis // *Food Rev. Intl.*, 1988, 4, p. 1–43.
56. Motohito T. Studies on the petroleum odor in canned chum salmon // *Mem. Fac. Fisheries.* — Hokkaido Univ., 1962, 10, p. 1–5.
57. Mussinan C. J., Wilson R. A., Katz I., Hruza A., Vock M. H. Identification and some flavor properties of some 3-oxazolines and 3-fhiazolines isolated from cooked beef // *Phenolic, Sulfur, and Nitrogen Compounds in Food Flavors* / G. Charalambous, I. Katz (eds). — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1976. — P. 133–145.
58. Neucere N. J., Jacks T. J., Sumrell G. Interactions of globular proteins with simple polyphenols // *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, p. 214–216.
59. Ney K. H. Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length // *Food Taste Chemistry* / J. C. Boudreau (ed.). — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1979. — P. 149–173.
60. Ney K. H. Bitterness of lipids // *Fette, Seifen, Anstrichm.*, 1979, 81, S. 467–469.
61. Ohloff G. Bifunctional unit concept in flavor chemistry // *Flavour '81* / P. Schreier (ed.). — Berlin: Walter de Grayter, 1981. — P. 757–770.
62. O'Mahony M. Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures. — NY: Marcel Dekker, 1986.
63. Reed D. R. Progress in human bitter phenylthiocarbamide genetics // *Genetic Variation in Taste Sensitivity* / J. Prescott, B. J. Tepper (eds). — NY: Marcel Dekker, 2004. — P. 43–61.
64. Richard H. M. J. Spices and condiments I // *Volatile Compounds in Foods and Beverages* / H. Maarse (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1991. — P. 411–447.
65. Scanlan R. A. (ed.). *Flavor Quality: Objective Measurement.* — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1977.
66. Schiffman S. S. Contribution of the anion to the taste quality of sodium salts // *Biological and Behaviorial Aspects of Salt Intake* / R. H. Cagan, M. R. Kare (eds). — NY: Academic Press, 1980. — P. 99–114.
67. Schreier P. (ed.). *Flavour '81.* — Berlin: Walter de Gruyter, 1981.
68. Shahidi F. (ed.). *Flavor of Meat and Meat Products.* — London: Blackie Academic & Professional, 1994. — P. 1–298.
69. Shallenberger R. S., Acree T. E. Molecular theory of sweet taste //. *Nature (London)*, 1967, 216, p. 480–482.
70. Shankaranarayana M. L., Raghaven B., Abraham K. O., Natarajan C. P. Sulphur compounds in flavours // *Food Flavours (Part A, Introduction)* / I. D. Morton, A. J. Macleod (eds). — Amsterdam: Elsevier Scientific, 1982. — P. 169–281.
71. Shaw P. E. Fruits II // *Volatile Compounds in Foods and Beverages* / H. Maarse (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1991. — P. 305–327.
72. Stone H., Sidel J. L. *Sensory Evaluation Practices.* — NY: Academic Press, 1985.
73. Smith A., Duncan W. R. H. Characterization of branched-chain lipids from fallow deer perinephric triacylglycerols by gas chromatography-mass spectrometry // *Lipids*, 1979, 14, p. 350–355.
74. Special Issue on Flavour Perception // *Food Sci. Technol.* 1996, 7, p. 457.
75. Swoboda P. A. T., Peers K. E. The significance of octa-l-cis-5-dien-3-one // *Progress in Flavour Research* / D. G. Land, H. E. Nursten (eds). — London: Applied Science Publishers, 1979. — P. 275–280.
76. Tanford C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of globular conformations of proteins // *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 84, p. 4240–4247.
77. Teranishi R., Flath R. A., Sugisawa H. (eds). *Flavor Research: Recent Advances.* — NY: Marcel Dekker, 1981.
78. Teranishi R., Wick E. L., Hornstein I. (eds). *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress.* — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
79. Tressl R., Bahri D., Engel K. H. Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (Agaricus campestris) // *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30, p. 89–93.
80. Tressl R., Holzer M., Apetz M. Biogenesis of volatiles in fruit and vegetables // *Aroma Research: Proceedings of the International Symposium on Aroma Research,* Zeist / H. Maarse, P. J. Groenen (eds). — Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), 1975. — P. 41–62.
81. Ueda Y., Sakaguchi M., Hirayama K. Characteristic flavor constituents in water extract of garlic // *Agr. Biol. Chem.*, 1990, 54, p. 163–169.
82. Ueda Y. Tsubuku T., Miyajima R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters // *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, 58, p. 108–110.

83. Ueda Y., Yonemitsu M., Tsubuku T., Sakaguchi M. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs // *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, 61, p. 1977–1980.
84. van Straten S., de Vrijer F., de Beauveser J. C. (eds). *Volatile Compounds in Food.* — 4th ed. — Zeist: Central Institute for Nutrition and Food Research, 1977.
85. Watson H. R. Flavor characteristics of synthetic cooling compounds // *Flavor: Its Chemical, Behavioral, and Commercial Aspects* / C. M. Apt (ed.). — Boulder, CO: Westview Press, 1978. — P. 31–50.
86. Whitfield F. B., Last J. H. Vegetables // *Volatile Compounds in Foods and Beverages* / H. Maarse (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1991. — P. 203–269.
87. Wittkowski R., Ruther J., Drinda H., Rafiei-Taghanaki F. Formation of smoke flavor compounds by thermal lignin degradation // *Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions* / R. Teranishi, G. R. Takeoka, M. Guntert (eds). — Washington, D.C.: American Chemical Society, 1992. — P. 232–243.
88. Wong E., Nixon L. N., Johnson C. B. Volatile medium chain fatty acids and mutton flavor // *J. Agric. Food Chem.*, 1975, 23, p. 495–498.
89. Yamaguchi S. The umami taste // *Food Taste Chemistry* / J. C. Boudreau (ed.). — Washington, D.C.: American. Chemical Society, 1979. — P. 33–51.
90. Yashimoto K., Iwami K., Mitsuda H. A new sulfur-peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine // *Agric. Biol. Chem.*, 1971, 35, p. 2059–2069.

11. ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Роберт К. Линдсей (*Robert C. Lindsay*)
Перевод И. С. Горожанкиной под науч. ред. канд. биол. наук Г. Н. Шатрова

Содержание

11.1. Введение. . . 632
11.2. Кислоты . . 633
11.2.1. Общие свойства. . . 633
11.2.2. Системы химического разрыхления теста . . . 634
11.3. Основания . . . 638
11.4. Буферные системы и соли. . 639
11.4.1. Буферные системы и регулирование pH пищевых продуктов. 639
11.4.2. Соли в продуктах переработки молока 641
11.4.3. Фосфаты и связывание воды в животных тканях 641
11.5. Комлексообразователи 642
11.6. Антиоксиданты. . . . 644
11.7. Противомикробные вещества . 646
11.7.1. Сульфиты и диоксид серы. 646
11.7.2. Соли азотной и азотистой кислот . . 649
11.7.3. Уксусная кислота. . 649
11.7.4. Пропионовая кислота 649
11.7.5. Сорбиновая кислота и другие кислоты со средней длиной цепи 650
11.7.6. Глицериловые эфиры 652
11.7.7. Аргинат лауриновой кислоты . . . 652
11.7.8. Натамицин 653
11.7.9. Бензойная кислота . 653
11.7.10. Парабены 654
11.7.11. Эпоксиды . . 655
11.7.12. Антибиотики . . . 656
11.7.13. Диэтилпирокарбонат 656
11.8. Интенсивные низкокалорийные подсластители . 657
11.8.1. Сульфоамиды — цикламат, сахарин и ацесульфам К . 658
11.8.2. Пептиды — аспартам, неотам и алитам. . . 659
11.8.3. Хлорсахариды. Сукралоза . 661
11.8.4. Прочие интенсивные низкокалорийные подсластители 662
11.9. Полиолы как подсластители, загустители и эмульгаторы. . . . 664
11.10. Стабилизаторы и загустители. . . . 667
11.11. Заменители жира . 668
11.11.1. Углеводные имитаторы жира . . . 668
11.11.2. Белковые имитаторы жира . . . 669
11.11.3. Синтетические триацилглицерины пониженной калорийности . . . 669
11.11.4. Синтетические заменители жира . . 670
11.11.4.1. Полидекстроза 670
11.11.4.2. Полиэфиры сахарозы . . . 671
11.12. Вещества, улучшающие жевательные свойства 671

11.13. Вещества, повышающие твердость изделий ..672
11.14. Внешний вид изделий и осветлители ..673
11.15. Отбеливатели муки и хлебопекарные улучшители ...676
11.16. Антислеживатели ..678
11.17. Газы и пропелленты ..678
11.17.1. Защита от кислорода .678
11.17.2. Карбонизация ..679
11.17.3. Пропелленты ..679
11.18. Сводная таблица добавок 680
Дополнительная литература .689
Литература .689

11.1. Введение

Многие вещества вводят в пищевые продукты как технологические и функциональные добавки, но зачастую эти ингредиенты нативно присутствуют в некоторых пищевых продуктах. Когда их вносят в продукты в ходе переработки сырья, эти химические вещества называют «пищевыми добавками». С позиций правового регулирования каждая пищевая добавка, чтобы ее применение было оправданным, должна придавать продукту какое-либо характерное свойство или выполнять ту или иную полезную и желаемую функцию. Обычно такими полезными функциями пищевых добавок считаются увеличение срока хранения, повышение пищевой ценности*, обеспечение и улучшение требуемых функциональных свойств, а также обеспечение потребительского признания продукта. Нормативными документами, регулирующими применение этих веществ в пищевых продуктах, категорически запрещено использование пищевых добавок для маскирования дефектов или порчи пищевых продуктов, а также для введения потребителя в заблуждение. Кроме того, применение пищевых добавок не рекомендуется, если аналогичные результаты можно получить путем применения экономически целесообразной, правильной производственной практики.

Диапазон компонентов пищевых продуктов, которые могут считаться достаточно важными для уделения им особого внимания в руководствах по пищевой химии, в последние годы существенно расширился, и некоторые из этих веществ можно применять аналогично традиционным пищевым добавкам. Вместе с тем растущее внимание к свойствам полезности для здоровья, обеспечиваемым отдельными пищевыми компонентами или их группами, привело к промышленному внедрению многих инновационных пищевых ингредиентов. Многие из них разрабатывались в целях решения сложных задач по составлению рецептур продуктов, удовлетворяющих специфические потребности (например, снижение калорийности жиров), а другие были разработаны в целях обеспечения специфических, полезных для здоровья свойств (например, растительные стерины для снижения уровня холестерина в крови). Несмотря на то что многие подобные ингредиенты, безусловно, попадают в категорию пищевых добавок, в настоящее время предпринимаются определенные усилия, чтобы отграничить их от сложившегося «отрицательного имиджа» пищевых добавок.

В последнее время традиционная терминология стала еще более «размытой». Примечательным стало широкое распространение понятий «функциональные продукты» и «функциональные пищевые ингредиенты», обозначающих пищевые продукты и ингредиенты с более высоким относительным содержанием полезных для здоровья веществ, чем традиционные аналоги. В результате понятия «функциональное назначение» и «функциональные пищевые ингредиенты» (в том смысле, который они имели относительно эффективности пищевых добавок) стали более узкими, и появилась необходимость в разработке альтернативной терминологии.

* В соответствии с международным, европейским и российским законодательством повышение пищевой ценности не относится к функциям пищевых добавок, а вещества, повышающие пищевую ценность, к пищевым добавкам не относятся. — *Примеч. науч. ред.*

Для многих пищевых добавок существуют натуральные аналоги, и все больше инновационных ингредиентов промышленно получают из натуральных источников. В настоящей главе основное внимание мы уделим назначению добавляемым к пищевым продуктам натуральных и синтетических веществ, а также дадим общий обзор их функциональных возможностей. Дополнительные сведения по химии специфических пищевых компонентов приводятся в других главах этой книги, посвященных соответствующим исходным компонентам. Например, натуральные вещества, которые зачастую применяются как пищевые добавки, рассматриваются в главе 4 (раздел 4.7.4, Антиоксиданты), в главе 7 (Витамины), в главе 8 (Минеральные вещества), в главе 9 (Красящие вещества), в главе 10 (Вкусоароматические вещества) и в главе 12 (Нутрицевтики).

11.2. Кислоты

11.2.1. Общие свойства

В природных системах широко распространены и органические, и неорганические кислоты, выполняющие самые разные функции — от промежуточных метаболитов до компонентов буферных систем. Кислоты добавляют в пищевые продукты в разных целях, в том числе и для облегчения переработки, где их естественная активность обеспечивает многие полезные результаты. Одной из наиболее важных функций кислот в составе пищевых продуктов является их роль в буферных системах (см. следующий раздел). Далее мы рассмотрим использование кислот и кислых солей в системах химического разрыхления теста, специфические кислотные ингибиторы роста и размножения микроорганизмов (в том числе сорбиновую и бензойную кислоты) и их роль в консервировании пищевых продуктов, а также функцию кислот как комплексообразователей. Кислоты играют важную роль в застывании пектиновых гелей (см. главу 3), они могут быть пеногасителями и эмульгаторами, а также вызывают коагуляцию молочных белков (см. главы 5 и 15) в производстве сыра и других кисломолочных продуктов (например, сметаны). При использовании природных заквасок продуцируемая стрептококками и лактобациллами молочная кислота (CH_3–CHOH–COOH) вызывает коагуляцию благодаря снижению значения pH до близкого к изоэлектрической точке казеина. Сыры зачастую производят путем внесения в охлажденное (4–8 °C) молоко сычужного фермента и таких подкислителей, как лимонная и соляная кислоты. Последующее повышение температуры молока до 35 °C вызывает формирование однородной гелевой структуры, однако добавление кислоты к теплому молоку приводит к свертыванию молока, а не к образованию геля.

Для медленного продуцирования кислоты в кисломолочных продуктах и в системах химического разрыхления теста также может использоваться δ-глюконолактон, который образуется из глюкозы (в водных системах это соединение подвергается медленному гидролизу с образованием глюконовой кислоты, рис. 11.1). Дегидратация молочной кислоты дает лактид (циклический дилактон, рис. 11.2), который в водных системах также выполняет функции медленно высвобождающейся кислоты. Реакция дегидратации происходит при низкой активности воды (a_w) и при повышенной температуре. Введение лактида в пищевые продукты с высоким значением a_w вызывает изменение направления процесса на обратное с образованием двух молей молочной кислоты.

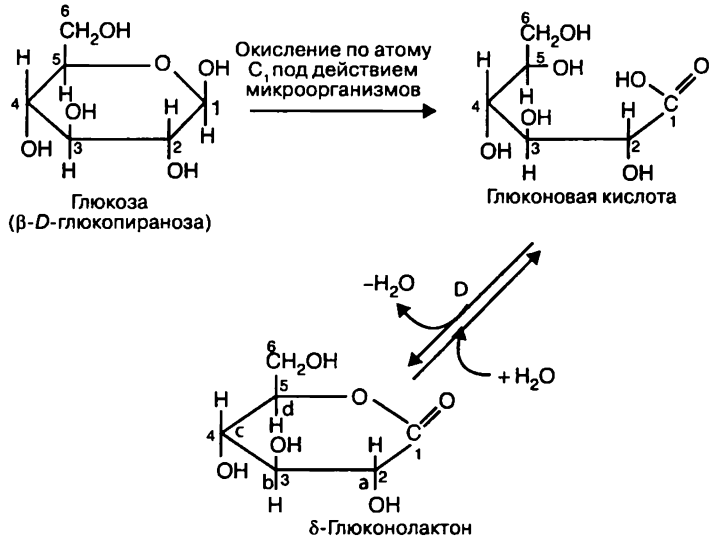


Рис. 11.1. Реакции образования глюконовой кислоты при ферментативном окислении глюкозы с последующим термическим расщеплением, в результате которой образуется δ-глюконолактон; при контакте δ-глюконолактона с водой последняя реакция меняет направление, что обеспечивает возможность подкисления пищевых продуктов путем медленного высвобождения кислоты

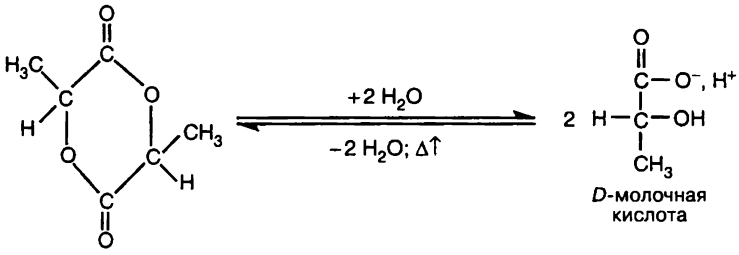


Рис. 11.2. Равновесная реакция образования молочной кислоты в результате гидролиза лактида

Такие кислоты, как лимонная, добавляют к некоторым умеренно кислым овощам и фруктам в целях снижения значения pH до менее чем 4,5. В консервированных продуктах это позволяет проводить стерилизацию при менее жестких температурных режимах, чем это необходимо для менее кислых продуктов, и предотвратить рост и размножение вредных микроорганизмов (например, *Clostridium botulinum*).

Кислый тартрат калия (HOOC–CHOH–CHOH–COOK) используют в производстве помадной массы и сливочных помадок для индуцирования ограниченного гидролиза (инверсию) сахарозы (см. главу 3). В результате инверсии сахарозы получаются фруктоза и глюкоза, улучшающие текстуру продукта благодаря подавлению чрезмерного роста кристаллов сахарозы. Указанные моносахариды подавляют кристаллизацию сахарозы, способствуют многокомпонентности сиропа, снижают активность воды в нем и соответствующую равновесную относительную влажность (РОВ).

Одним из наиболее важных свойств кислот в пищевых продуктах является их способность давать кислый и острый вкус [22] (см. главу 10), а также модифицировать и усиливать восприятие других вкусоароматических веществ. В образовании кислого вкусового ощущения участвует ион водорода или гидроксония (H_3O^+). Кроме того, существенный вклад во вкус и аромат пищевых продуктов вносят низкомолекулярные свободные жирные кислоты (C_2 C_{12}). Например, главную роль в формировании вкуса и запаха («флейвора») уксуса играет уксусная кислота, а характерный привкус гидролитической прогорклости молочных продуктов дает масляная кислота в относительно высоких концентрациях (при более низких концентрациях она способствует формированию характерного вкуса и аромата сыра и сливочного масла).

Очевидно, что большое значение в выборе кислоты для конкретной области применения является ее способность влиять на значение pH пищевых продуктов, что в значительной мере определяется степенью диссоциации кислотной функциональной группы в водных системах. Константы диссоциации для некоторых используемых в пищевых продуктах кислот приведены в табл. 11.1 [59]. К наиболее часто используемым в пищевой промышленности органическим кислотам относятся уксусная (CH_3COOH), молочная (CH_3–CHOH–COOH), лимонная (HOOC–CH_2–COH(COOH)–CH_2–COOH), яблочная (HOOC–CHOH–CH_2–COOH), фумаровая (HOOC–CH=CH–COOH), янтарная (HOOC–CH_2–CH_2–COOH) и винная (HOOC–CHOH–CHOH–COOH). Наиболее широко используемым неорганическим кислотным пищевым подкислителем является ортофосфорная кислота (H_3PO_4), которую применяют в производстве ароматизированных газированных напитков, особенно в напитках на основе колы и в рутбире*

Сильные минеральные кислоты (например, HCl, H_2SO_4) зачастую имеют слишком высокую для обычного подкисления степень диссоциации, и их прямое внесение может привести к проблемам с качественными характеристиками пищевых продуктов. Вместе с тем использование минеральных кислот с высокой степенью диссоциации бывает полезно и экономически целесообразно в производстве некоторых ингредиентов типа белковых гидролизатов. Другой вариант ингредиента представляет собой кислый сульфат натрия, например бисульфат натрия ($NaHSO_4$), который относительно недавно получил в США разрешение на применение в пищевых продуктах и ему был присвоен статус *GRAS* (*Generally Recognizes As Safe*, «признан в целом безвредным»). Кислый сульфат натрия получают в форме гранулированного порошка, и его значение pK_a обеспечивает такие же подкисляющие свойства, как и у ортофосфорной кислоты.

11.2.2. Системы химического разрыхления теста

Системы химического разрыхления состоят из соединений, которые во всех видах теста в соответствующих влажностно-температурных условиях вступают в реакцию с выделением газа. В ходе выпечки этот

* Рутбир — сладкий газированный напиток, ароматизированный кореньями и корками плодов различных растений. — *Примеч. ред.*

Таблица 11.1
Константы диссоциации некоторых пищевых кислот (при 25 °С). По [59]

Кислота	Ступень диссоциации	pK_a	Кислота	Ступень диссоциации	pK_a
Органические кислоты			*Неорганические кислоты*		
Уксусная		4,75	Угольная	1	6,37
				2	10,25
Адипиновая	1	4,43	*о*-Фосфорная	1	2,12
	2	5,41		2	7,21
Бензойная		4,19		3	12,67
п-Масляная		4,81			
Лимонная		3,14	Пирофосфорная	1	0,85
	2	4,77		2	1,49
	3	6,39		3	5,77
Муравьиная		3,75		4	8,22
Фумаровая	1	3,03	Серная	2	1,92
	2	4,44			
Гексановая		4,88			
Молочная		3,08			
Яблочная	1	3,40			
	2	5,10			
Пропионовая		4,87			
Янтарная	1	4,16			
	2	5,61			
Винная	1	3,22			
	2	4,82			

газ благодаря увеличению объема удерживаемого воздуха и влажного пара придает готовым изделиям характерную ячеистую пористую структуру. Системы химического разрыхления вносят в муку для самоподнимающегося теста, в готовые хлебопекарные смеси, в пекарские порошки, а также в замороженные тестовые полуфабрикаты [25].

Единственным газом в используемых в настоящее время системах химического разрыхления теста является диоксид углерода, который образуется из карбонатной или бикарбонатной соли. Чаще всего разрыхляющей солью служит бикарбонат натрия ($NaHCO_3$), хотя в производстве печенья иногда используют карбонат и бикарбонат аммония — соответственно $(NH_4)_2CO_3$ и NH_4HCO_3. Обе эти соли аммония при температуре выпечки разлагаются и тем самым не требуют, как бикарбонат натрия, добавления разрыхляющей кислоты. Бикарбонат калия ($KHCO_3$) традиционно применяли как компонент разрыхляющих систем в специальных изделиях с пониженным содержанием натрия, но возможности его применения ограничены гигроскопичностью этого соединения и наличием легкого горького привкуса.

Бикарбонат натрия достаточно хорошо растворим в воде (619 г/100 см^3) и полностью ионизируется (уравнения 11.1, 11.2, и 11.3):

$$NaHCO_3 \rightleftarrows Na^+ + HCO^-_3 \qquad (11.1)$$

$$HCO^-_3 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3 + OH^- \qquad (11.2)$$

$$HCO^-_3 \rightleftarrows CO^{2-}_3 + H^+ \qquad (11.3)$$

Эти реакции, естественно, проходят только в простых водных растворах. В тесте распределение ионов существенно усложняется, так как для реакций доступны белки и другие ионообразующие натуральные

соединения. В присутствии ионов водорода, поступающих, главным образом, от разрыхляющих кислот и из теста, бикарбонат натрия вступает в реакцию с высвобождением диоксида углерода (уравнение 11.4 для угольной кислоты):

$$R{-}COO^-, H^+ + NaHCO_3 \rightleftarrows R{-}COO^-, Na^+ + H_2O + CO_2\uparrow \quad (11.4)$$

Поскольку избыток бикарбоната натрия придает выпекаемому изделию мыльный привкус, а избыток кислоты — кислый, иногда горький привкус, необходимо обеспечить правильное соотношение кислоты и бикарбоната натрия. Нейтрализующая способность разрыхляющих кислот не одинакова, и относительная активность кислоты определяется ее нейтрализующим значением, определяемым путем расчета массовых частей бикарбоната натрия, способных нейтрализовать 100 массовых частей разрыхляющей кислоты [53]. В присутствии натуральных ингредиентов муки количество разрыхляющей кислоты, требуемое для получения нейтрального или любого другого желаемого значения pH выпекаемого продукта, может сильно отличаться от теоретической величины, определяемой для простой системы. Тем не менее, эти нейтрализующие значения полезны для разработки исходных рецептур разрыхляющих систем. Остаточное содержание солей после правильно сбалансированного процесса разрыхления помогает стабилизировать значение pH готовых изделий.

Разрыхляющие кислоты зачастую с трудом воспринимаются как кислоты в обычном понимании, однако для высвобождения диоксида углерода они должны служить донором ионов водорода. Солями частично нейтрализованных кислот являются соли фосфорной кислоты и кислый тартрат калия; алюмосульфат натрия реагирует с водой с образованием серной кислоты (уравнение 11.5). Как мы уже отмечали, δ-глюконолактон представляет собой лактон (внутримолекулярный эфир), который в водных системах подвергается медленному гидролизу с образованием глюконовой кислоты.

$$Na_2SO_4\ \ Al_2(SO_4)_3 + 6H_2O \rightleftarrows Na_2SO_4 + 2Al(OH)_3 + 3H_2SO_4 \quad (11.5)$$

Разрыхляющим кислотам обычно присуща ограниченная растворимость в воде при комнатной температуре, причем некоторые кислоты менее растворимы, чем другие. Именно этим различием в растворимости (доступности кислот) обусловлена начальная скорость высвобождения диоксида углерода при комнатной температуре, благодаря чему была создана классификация разрыхляющих кислот по скорости их действия. Например, если соединение умеренно растворимо, то диоксид углерода выделяется быстро и кислота называется быстродействующей. И наоборот, если кислота растворяется медленно, она является медленнодействующей. Разрыхляющая кислота обычно высвобождает часть диоксида углерода перед выпечкой, а оставшуюся часть — при повышении температуры в процессе выпечки.

График выделения диоксида углерода при температуре 27 °C для быстродействующего однозамещенного фосфата кальция моногидрата [$Ca(H_2PO_4)_2\ \ H_2O$] и медленнодействующего алюмофосфата натрия [$NaH_{14}Al_3(PO_4)_8\ \ 4H_2O$] приведены на рис. 11.3 [53]. Из более хорошо растворимого однозамещенного фосфата кальция моногидрата за 10 мин реакции свыше 60% диоксида углерода очень быстро высвобождается, а из медленнодействующего алюмофосфата натрия — только 20%. Благодаря покрытию из гидратированного алюминия последнее соединение вступает в реакцию в небольшой степени, пока не произойдет его активация нагреванием. На рис. 11.3 показан график низкотемпературного высвобождения диоксида углерода из безводного однозамещенного фосфата кальция [$Ca(H_2PO_4)_2$] с покрытием (кристаллы этой разрыхляющей кислоты покрыты соединениями слаборастворимых фосфатов щелочных металлов). Постепенное выделение диоксида углерода в течение 10 мин реакции соответствует времени, необходимому воде для проникновения через этот защитный слой. Такой режим очень желателен для некоторых изделий, выпекаемых с отлежкой перед выпечкой.

Заключительное модифицирующее воздействие на текстуру обеспечивает высвобождение из разрыхляющей системы в процессе выпечки оставшейся части диоксида углерода. В большинстве разрыхляющих систем скорость выделения диоксида углерода с повышением температуры возрастает. Влияние повышения температуры на скорость высвобождения диоксида углерода из медленнодействующего кислого пирофосфата натрия ($Na_2H_2P_2O_7$) показано на рис. 11.4. Даже небольшое повышение температуры (с 27 до 30 °C) заметно ускоряет выделение газа. Температура около 60 °C вызывает полное высвобождение диоксида углерода в течение 1 мин. Некоторые разрыхляющие кислоты менее чувствительны к действию

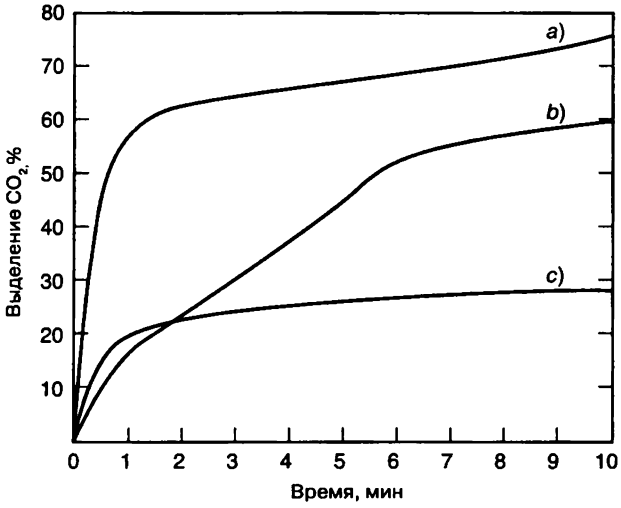


Рис. 11.3. Образование диоксида углерода при 27 °С в результате реакции $NaHCO_3$ с (*a*) однозамещенным фосфатом кальция H_2O; (*b*) безводным однозамещенным фосфатом кальция с покрытием и (*c*) с 1-3-8-алюмофосфатом натрия. По [53]

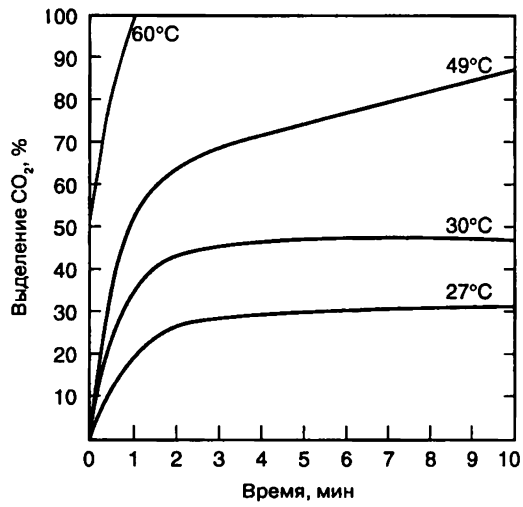


Рис. 11.4. Влияние температуры на скорость выделения диоксида углерода при реакции $NaHCO_3$ и медленнодействующего кислого пирофосфата натрия. По [53]

высоких температур и не проявляют сильной активности до тех пор, пока не будет достигнута температура близкая к максимальной температуре выпечки. При комнатной температуре двухзамещенный фосфат кальция ($CaHPO_4$) в реакцию не вступает, так как при этой температуре он образует слабощелочной раствор, однако при температурах выше 60 °С ионы водорода высвобождаются и активируют процесс разрыхления. Такое замедленное действие ограничивает применение $CaHPO_4$ в продуктах, требующих длительной выпечки, в частности некоторых видах кексов. Общеприняты композиции разрыхлителей с использованием одного и более кислотных компонентов, причем зачастую разрыхляющие системы специально рассчитывают для конкретного вида применения в густом или жидком тесте.

Некоторые современные кислые разрыхлители включают кислый тартрат калия, алюмосульфат натрия, δ-глюконолактон, а также орто- и пирофосфаты. К этим фосфатам относятся фосфат кальция, алюмофосфат натрия и кислый пирофосфат натрия. Некоторые свойства этих кислых разрыхлителей приведены в табл. 11.2. Следует иметь в виду, что приведены только примеры, и для модификации и контроля кислых фосфатных разрыхлителей разработана специальная технология [53].

Таблица. 11.2
Некоторые свойства распространенных разрыхляющих кислот. По [53]

Кислота	Формула	Нейтрализующее значение [a]	Относительная скорость реакции при комнатной температуре [b]
Алюмосульфат натрия	$Na_2SO_4\ Al_2(SO_4)_3$	100	Медленная
Двузамещенный дигидрат фосфата кальция	$CaHPO_4\ 2H_2O$	33	Не вступает в реакцию
Однозамещенный моногидрат фосфата кальция	$Ca(H_2PO_4)_2\ H_2O$	80	Высокая
Алюмофосфат натрия	$NaH^{14}Al_3(PO_4)_8 \cdot 4H_2O$	100	Медленная
Кислый пирофосфат натрия (медленнодействующий)	$Na_2H_2P_2O_7$	72	Медленная
Кислый тартрат калия	$KHC_4H_4O_6$	50	Средняя
δ-Глюконолактон	$C_6H_{10}O_6$	55	Медленная

[a] В простых модельных системах; приведена массовая доля $NaHCO_3$, необходимая для нейтрализации 100 масс. частей разрыхляющей кислоты.

[b] Скорость выделения CO_2 в присутствии $NaHCO_3$.

Большинство химических разрыхлителей теста, применяемых как в домашних условиях, так и в пекарнях, выпускают в виде пекарских порошков, состоящих из бикарбоната натрия, соответствующих кислот и крахмала, а также других наполнителей. По стандартам США на пекарские порошки необходимо, чтобы данная композиция давала не менее 12 %масс. доступного диоксида углерода и содержала 26–30 %масс. бикарбоната натрия. Традиционные пекарские порошки с кислым тартратом калия уже почти полностью вытеснены полуфабрикатами двойного действия, в которых наряду с $NaHCO_3$ и крахмалом присутствует однозамещенный моногидрат фосфата кальция [$Ca(H_2PO_4)_2$ H_2O], обеспечивающий быстродействие на стадии замеса теста, и алюмосульфат натрия [Na_2SO_4 $Al_2(SO_4)_3$], не вступающий в реакцию до тех пор, пока не поднимется температура в процессе выпечки.

Увеличение ассортимента удобных в приготовлении полуфабрикатов стимулировало рост реализации готовых смесей для выпечки и замороженного теста. В пекарских порошках для выпечки белых и желтых кексов чаще всего используют безводный однозамещенный фосфат кальция [$Ca(H_2PO_4)_2$] и алюмофосфат натрия [$NaH_{14}Al_3(PO_4)_8 \cdot 4H_2O$], а в смесях для шоколадных кексов — безводный однозамещенный фосфат кальция и кислый пирофосфат натрия ($Na_2H_2P_2O_7$) [53]. Стандартные кислые смеси содержат 10–20% быстродействующего безводного монофосфата и 80–90% медленнодействующих соединений алюмофосфата натрия или кислого пирофосфата натрия. Разрыхляющие кислоты в готовых смесях для выпечки печенья и бисквитов обычно состоят из 30–50% безводного однозамещенного фосфата кальция и 50–70% алюмофосфата натрия или кислого пирофосфата натрия. В первых смесях для изделий из самоподнимающейся и кукурузной муки содержался однозамещенный фосфат кальция моногидрат [$Ca(H_2PO_4)_2$ H_2O], но в настоящее время обычно применяют безводный однозамещенный фосфат кальция с покрытием и алюмофосфат натрия [53].

Замороженному тесту для выпечки печенья и трубочек требуется небольшое начальное высвобождение диоксида углерода при замесе и сильное — при выпечке. В рецептуре теста для печенья обычно содержится 1,0–1,5% бикарбоната натрия и 1,4–2,0% медленнодействующих разрыхлителей — однозамещенного фосфата кальция с покрытием и кислого пирофосфата натрия (на общую массу теста). Пирофосфаты тем удобны, что их можно выпускать с широким диапазоном реакционной способности. Например, пирофосфатаза муки способна гидролизовать кислый пирофосфат натрия в ортофосфат (рис. 11.5), а в результате реакции бикарбоната натрия и пирофосфата получается некоторое количество трехзамещенного моногидропирофосфата натрия, который также гидролизуется до ортофосфатов. В результате такой ферментативной активности образуется газ, способствующий герметизации упаковок замороженного теста, но вместе с тем могут образоваться крупные кристаллы ортофосфатов, которые потребитель может ошибочно принять за битое стекло.

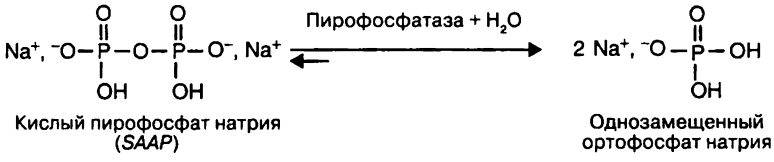


Рис. 11.5. Ферментативный гидролиз кислого пирофосфата натрия

11.3. Основания

Основные (щелочные) вещества применяются в пищевой промышленности для решения многих прикладных задач, и хотя большая часть этих задач относится к буферизации и регулировке значения pH, их применяют и для образования диоксида углерода, улучшения цвета и вкуса продуктов, а также для растворения белков и чистки растительного сырья химическими методами. Роль карбонатных и бикарбонатных солей в продуцировании диоксида углерода при выпечке мы рассмотрели в предыдущем разделе.

Для улучшения цвета и вкуса некоторых пищевых продуктов щелочная обработка необходима. Так, зрелые оливки обрабатывают растворами гидроксида натрия (0,25–2,0%), что способствует удалению горьких компонентов и придает оливкам более темный цвет. Претцели перед выпечкой погружают в раствор 1,25% гидроксида натрия при температуре 87–88 °C в целях модификации белков и крахмала для получения более гладкой поверхности и образования при выпечке насыщенного коричневого цвета. Считается, что щелочная обработка теста для изделий из кукурузной муки, в том числе тортилий, разрушает нестойкие к воздействию щелочей дисульфидные связи и улучшает вкус. Соевые белки в результате щелочной обработки растворяются, что вызывает беспокойство по поводу щелочной рацемизации аминокислот (см. главу 5) и потери нутриентов. Небольшие количества бикарбоната натрия используют в производстве

конфет типа «грильяж с арахисом» в целях усиления потемнения и карамелизации, а также для формирования слегка пористой структуры благодаря выделению диоксида углерода. Основания (обычно карбонат калия) используют также в переработке какао-бобов для получения темного («датского») шоколада [41]. Повышенное значение pH катализирует реакции меланоидинообразования (реакции Майяра) и полимеризацию флавоноидов (см. главу 9), что обусловливает ровный, менее кислый и горький вкус шоколада, более темный цвет и небольшое повышение растворимости.

Для обеспечения более стабильных желаемых свойств иногда требуется доведение значений pH пищевых систем до более высоких. Например, такие щелочные соли, как двухзамещенный фосфат натрия, трехзамещенные фосфат и цитрат натрия используют в производстве плавленого сыра (1,5–3%) для повышения значения pH с 5,7 до 6,3 и улучшения диспергирования белка (казеина). Такое взаимодействие соли и белка улучшает эмульгирующую и водосвязывающую способности белков сыра [48], поскольку соли связывают кальциевые компоненты мицелл казеина с образованием комплексных соединений.

Пудинги быстрого приготовления на основе молочного геля приготавливают путем соединения содержащих предварительно клейстеризованный крахмал сухих смесей с холодным молоком и недолгого выдерживания их при температурах охлаждения. Щелочные соли — четырехзамещенный пирофосфат натрия ($Na_4P_2O_7$) и двухзамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4) — в присутствии ионов кальция в молоке обусловливают гелеобразование молочных белков в присутствии предварительно клейстеризованного крахмала. Для получения хороших пудингов оптимальное значение pH составляет 7,5–8,0. Несмотря на то что некоторая часть щелочности обусловлена щелочными фосфатными солями, зачастую добавляют и другие подщелачивающие соединения [13].

Добавление фосфатов и цитратов изменяет солевой баланс в жидких молочных продуктах путем образования комплексов с ионами кальция и магния из казеина. Этот механизм еще до конца не ясен, но в зависимости от типа и концентрации вносимой соли система молочных белков может стабилизироваться, дестабилизироваться или образовывать гель.

В производстве таких продуктов, как кислосливочное масло, щелочные вещества применяют для нейтрализации избытка кислоты. Перед сбиванием масла сливки ферментируют с использованием молочнокислых бактерий, в результате чего их титруемая кислотность становится 0,75% в пересчете на молочную кислоту. Затем вносят щелочи, чтобы достичь примерного уровня титруемой кислотности 0,25%. Уменьшение кислотности повышает эффективность сбивания масла и замедляет развитие посторонних прогорлклых привкусов и запаха. В качестве нейтрализаторов для пищевых продуктов применяют бикарбонат натрия $NaHCO_3$, карбонат натрия Na_2CO_3, карбонат магния $MgCO_3$, оксид магния MgO, гидроксид кальция $Ca(OH)_2$ и гидроксид натрия NaOH — как по отдельности, так и в их сочетании. На выбор того или иного соединения влияют растворимость, пенообразующие свойства в результате выделения диоксида углерода и концентрация. Чрезмерное использование щелочных веществ обусловливает образование мыльного привкуса — особенно в присутствии больших количеств жирных кислот.

Сильные основания используют для чистки различных фруктов и овощей химическими методами* Выдерживание продукта в горячих растворах температурой 60–82 °C гидроксида натрия (около 3%) с последующей щадящей абразивной обработкой способствует удалению кожуры и значительно сокращает объем отработанной воды по сравнению с другими традиционными методами очистки плодов. Основой для таких технологий очистки является различие в растворимости клеточных и тканевых компонентов (особенно растворимы пектиновые вещества срединной ламеллы).

11.4. Буферные системы и соли

11.4.1. Буферные системы и регулирование pH пищевых продуктов

Поскольку большинство пищевых продуктов представляет собой сложные биологические материалы, в них содержится много веществ, способных участвовать в регулировании значения pH, а также буферные системы, в том числе белки, органические кислоты и соли слабой неорганической фосфорной кислоты.

* В мировой практике функция очистки фруктов и овощей относится не к функциям пищевых добавок, а к функциям технологических вспомогательных средств, так называемых «технологических добавок». — *Примеч. науч. ред.*

Молочная кислота и соли фосфорной кислоты наряду с белками играют важную роль в регулировании pH в животных тканях, тогда как в растительных тканях важную роль играют многоосновные карбоновые кислоты, соли фосфорной кислоты и белки. Буферное действие аминокислот и белков, а также влияние значения pH и солей на функциональные свойства этих соединений рассматриваются в главе 5. В растениях распространены буферные системы со следующими кислотами: лимонной (лимоны, томаты, ревень), яблочной (яблоки, томаты, салат-латук), щевелевой (ревень, салат-латук) и винной (виноград, ананас), и обычно при поддержании значения pH они взаимодействуют с солями фосфорной кислоты. Молоко представляет собой сложную буферную систему из-за присутствия в нем диоксида углерода, белков, фосфатов, цитратов и некоторых других минорных компонентов.

При необходимости изменения значения pH обычно целесообразно стабилизировать pH пищевого матрикса на желаемом уровне с помощью некоторой буферной системы. В сыре и маринованных овощах это происходит естественным путем при образовании молочной кислоты в процессе ферментации. Кроме того, при использовании большого количества кислоты в пищевых продуктах и напитках иногда бывает желательно уменьшить резкость кислого вкуса и получить продукт с более мягким вкусом без постороннего привкуса. Обычно это осуществляют с помощью буферной системы с преобладанием соли слабой органической кислоты. В основе регулирования значения pH в этих системах лежит ионный эффект, когда добавляемая соль содержит ион, уже присутствующий в имеющейся слабой кислоте. Добавляемая соль немедленно ионизируется, что приводит к подавлению ионизации этой кислоты, снижению кислотности и более стабильному pH. Эффективность конкретного буфера зависит от концентрации образующих буферный раствор веществ. Поскольку в нем существует пул недиссоциированной кислоты и диссоциированной соли, буфер противодействует изменениям pH. Например, внесение относительно большого количества сильной кислоты (например, соляной) к системе «уксусная кислота–ацетат натрия» заставляет ионы водорода вступать в реакцию с пулом ионов ацетата, повышая концентрацию слабо ионизированной уксусной кислоты, благодаря чему значение pH остается относительно стабильным. Аналогичным образом добавление гидроксида натрия заставляет гидроксильные ионы реагировать с ионами водорода с образованием недиссоциированных молекул воды.

Титрование буферных систем и получающиеся в результате кривые титрования (зависимость значения pH от объема добавленного основания) показывают стойкость этих систем к изменению значения pH. Если буфер со слабой кислотой титруется основанием, то значение pH по мере приближения системы к точке нейтрализации постепенно и стабильно возрастает, то есть величина изменения pH на 1 $см^3$ добавленного основания невелика. В начале титрования слабые кислоты лишь незначительно диссоциированы, однако добавление гидроксильных ионов сдвигает равновесие в сторону диссоциированных молекул и в конечном счете буферная емкость истощается.

В общем виде для некоторой кислоты *HA*, находящейся в равновесии с ионами (H^+) и (A^-), это равновесное состояние можно представить в виде уравнения (11.6):

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^- \tag{11.6}$$

$$K_a^1 = \frac{[H^+][A^-]}{HA}. \tag{11.7}$$

Константу K_a^1 называют кажущейся константой диссоциации (см. уравнение 11.7), и она является характеристикой конкретной кислоты. Кажущаяся K_a^1 становится равной концентрации ионов водорода $[H^+]$, когда концентрация анионов $[A^-]$ становится равной концентрации недиссоциированной кислоты $[HA]$. Эта ситуация приводит к возникновению точки перегиба на кривой титрования — соответствующее этой точке значение pH называются величиной pK_a^1 данной кислоты. Следовательно, для слабой кислоты pH равно pK_a^1, когда концентрации кислоты и сопряженного с данной кислотой основания одинаковы (уравнение 11.8):

$$pH = pK_a^1 = \lg[H^+] \tag{11.8}$$

Удобный способ расчета примерного значения pH буферной смеси при известном значении pK_a^1 кислоты дает уравнение (11.11), которое получается решением сначала уравнения (11.7) для $[H^+]$, что дает уравнение (11.9):

$$[H^+] = K_a^1 \frac{[HA^-]}{[A^-]} = K_a^1 \frac{[\text{Кислота}]}{[\text{Соль}]}. \quad (11.9)$$

Поскольку соль в растворе почти полностью диссоциирует, исходят из того, что ее концентрация равна концентрации сопряженного основания $[A^-]$, и отрицательные логарифмы членов дают в результате уравнение (11.10). Подставляя pH вместо $-\log [H^+]$ и pK_a^1 вместо $-\log K_a^1$, получают уравнение (11.11), по которому можно рассчитать значение pH буферной системы, получаемой из любой слабой кислоты, диссоциирующей на H^+ и A^-

$$-\log [H^+] = -\log K_a^1 - \log \frac{[\text{Кислота}]}{[\text{Соль}]}; \quad (11.10)$$

$$\text{pH} = pK_a^1 + \log \frac{[\text{Соль}]}{[\text{Кислота}]} = pK_a^1 + \log \frac{[A^-]}{[HA]}. \quad (11.11)$$

При расчете значений pH буферных растворов важно понимать, что кажущаяся K_a^1 отличается от K_a, истиной константы диссоциации, однако для любого буфера при изменении pH значение K_a^1 остается постоянным (при условии, что общая ионная сила раствора остается одной и той же).

В пищевой промышленности для регулирования pH и кислотности обычно используют натриевые соли глюконовой, уксусной, лимонной и фосфорной кислот. Цитраты для модификации кислотности обычно предпочтительнее фосфатов, так как они дают более мягкий кислый вкус. Если требуется получить продукт с пониженным содержанием натрия, то соли натрия можно заменить буферными солями калия. Соли кальция, как правило, не используют из-за их более слабой растворимости и несовместимости с другими компонентами системы. Эффективными буферными диапазонами для разных сочетаний кислот и солей считаются: для лимонной кислоты с цитратом натрия — pH 2,1—4,7, для уксусной кислоты с ацетатом натрия —3,6—5,6, а для трех орто- и пирофосфатных анионов — соответственно, 2,0—3,0, 5,5—7,5 и 10—12.

11.4.2. Соли в продуктах переработки молока

Соли широко используются в производстве плавленых сыров и сырных продуктов для создания однородной гладкой текстуры. Такие добавки иногда называют «эмульгирующими солями» (солями-плавителями) благодаря их свойству способствовать диспергированию жиров. Хотя механизм эмульгирующей способности остается не до конца ясным, известно, что анионы солей в плавленом сыре образуют комплексы с кальцием и выводят его из *пара*-казеинового комплекса, что вызывает перегруппировку и обнажение как полярных, так и неполярных областей сырных белков. Считается также, что анионы этих солей участвуют в образовании ионных мостиков между молекулами белка и, таким образом, создают устойчивый матрикс, захватывающий и удерживающий жир в плавленом сыре [48]. К таким солям-плавителям относятся одно-, двух- и трехзамещенный фосфат натрия, двухзамещенный фосфат кальция, гексаметафосфат натрия, кислый пирофосфат натрия, четырехзамещенный пирофосфат натрия, алюмофосфат натрия и другие конденсированные фосфаты, трехзамещенные цитраты натрия и калия, тартрат натрия и тартрат калия-натрия (E337).

Добавление к сгущенному молоку таких фосфатов, как трехзамещенный фосфат натрия, предотвращает разделение фаз молочного жира и воды. Требуемое для внесения количество варьирует в зависимости от времени года и источника молока. Концентрированное УВТ-стерилизованное молоко зачастую при хранении сгущается, а внесение таких полифосфатов, как гексаметафосфат натрия, препятствует образованию геля благодаря денатурации и растворению белка, а также образованию комплексов кальция и магния с фосфатами.

11.4.3. Фосфаты и связывание воды в животных тканях

Добавление соответствующих фосфатов повышает ВУС (влагоудерживающую способность) сырого и приготовленного мяса [27]. Фосфаты используют в производстве колбасных изделий, соленой ветчины, мяса птицы и морепродуктов для уменьшения потерь тканевого сока и (в последнее время) для повышения

сочности расфасованных свежих свинины и говядины. Чаще всего к обработанному мясу, мясу птицы и морепродуктам добавляют триполифосфат натрия ($Na_5P_3O_{10}$), зачастую в смеси с гексаметафосфатом натрия $(Na\ PO_3)_n$, где $n = 10–15$, что позволяет повысить стойкость к присутствующим в рассолах ионам кальция. При использовании в рассолах со значительными количествами кальция орто- и пирофосфаты зачастую выпадают в осадок, но при комплексообразовании кальция с гексаметафосфатом комплексы остаются растворимыми, благодаря чему предотвращается выпадение фосфата кальция в осадок.

Несмотря на многочисленные исследования до сих пор не до конца ясен механизм, благодаря которому щелочные фосфаты и полифосфаты усиливают гидратирование. Механизм такого действия может включать изменение значения pH (см. главу 16), влияние ионной силы, а также специфические взаимодействия анионов фосфата с двухвалентными катионами и миофибриллярными белками. Многие ученые считают, что основной функцией полифосфатов является комплексообразование с кальцием и возникающее в результате разрыхление структуры ткани. Кроме того, считается, что связывание анионов полифосфата с белками и одновременное расщепление поперечных сшивок между актином и миозином приводит к увеличению сил электростатического отталкивания между пептидными цепями и разбуханию мышечной системы. При доступности внешней воды она может иммобилизоваться внутри несвязанной белковой сети. Более того, с увеличением ионной силы взаимодействие между белками может ослабевать до такой степени, что часть миофибриллярных белков образует коллоидный раствор. В продуктах из измельченного мяса типа колбас и сосисок добавление хлорида натрия (2,5–4,0%) и полифосфатов (0,35–0,5%) способствуют формированию более стабильной эмульсии, а после кулинарной обработки — образованию связанной сети коагулированных белков.

Если индуцированная фосфатом солюбилизация происходит сначала на поверхности мышечных тканей (например, у погружаемых в раствор полифосфата (6–12%-ный, ВУС 0,35–0,5%, рыбного филе, моллюсков и мяса птицы), то при кулинарной обработке образуется слой коагулированного белка, увеличивающий ВУС продукта [38].

11.5. Комлексообразователи

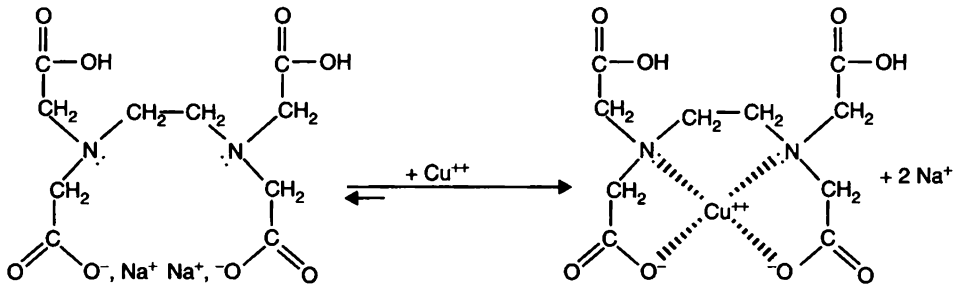
Важную роль в стабилизации пищевых продуктов благодаря реакциям с металлическими и щелочноземельными ионами играют вещества-комплексообразователи (секвестранты), которые изменяют свойства ионов и их роль в пищевых продуктах*. Многие используемые в пищевой промышленности комплексообразователи являются натуральными веществами — например, многоосновные карбоновые кислоты (лимонная, яблочная, винная, щавелевая и янтарная), полифосфорные кислоты (аденозинтрифосфат и пирофосфат) и макромолекулы (порфирины и белки)**. В состав природных комплексных соединений входят многие металлы, в том числе магний в хлорофилле, медь, цинк и магний в ферментах, железо в таких белках, как ферритин, а также железо в порфириновом кольце миоглобина и гемоглобина. При высвобождении ионов металлов в ходе гидролитических или других реакций они могут участвовать в реакциях, приводящих к обесцвечиванию, окислительному прогоркании, помутнению и изменению вкуса и запаха пищевых продуктов. Для образования комплексов с ионами металлов и тем самым стабилизации пищевых продуктов иногда добавляют комплексообразователи.

Любая молекула или ион с неподеленной парой электронов может координироваться с ионами металлов или образовывать с ними комплексы, то есть образовывать комплексные соединения с металлами в благоприятном окружении могут соединения, содержащие две и более функциональных групп (–OH, –SH, –COOH, $–PO_3H_2$, C=O, $–NR_2$, –S– и –O–), правильно расположенные стереометически. Наиболее широко распространенными комплексообразователями в пищевых продуктах являются лимонная кислота и ее производные, различные фосфаты, а также соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (*EDTA*, ЭДТА). Обычно для стабильного комплексообразования необходима способность комплексообразователей (лигандов) образовывать пяти- или шестизвенные циклы с металлом. Например, ЭДТА с катионами

* В РФ комплексообразователи не выделяются в отдельную функциональную группу пищевых добавок, их относят к антиокислителям. — *Примеч. науч. ред.*

** Щавелевая кислота, аденозинтрифосфат и макромолекулы (порфирины и белки) в мировой практике в качестве пищевых добавок не используются. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.: (495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com



Динатриевая соль ЭДТА Хелатное соединение [ЭДТА – катион меди]

Рис. 11.6. Образование комплексного соединения (катализатора окисления липидов) с катионом меди с участием динатриевой соли ЭДТА

меди дает высокостабильные комплексоны благодаря образованию внутренних координационных связей с участием электронных пар атомов азота и свободных электронных пар атомов кислорода из анионов двух из четырех карбоксильных групп (рис. 11.6).

Пространственная конфигурация комплекса катиона меди с ЭДТА такова, что позволяет иону меди дополнительно взаимодействовать со свободными электронными парами атомов кислорода, принадлежащих анионам двух оставшихся карбоксильных групп, что приводит к образованию очень стабильного комплексного соединения, в котором использованы все шесть групп-доноров электронов.

Помимо стерических и электронных факторов на образование стабильных хелатных комплексов с металлами влияет также значение pH. Неионизированная группа карбоновой кислоты сама не является эффективным донором электронов, но таковым является ион карбоксильной группы. Разумное повышение значения pH позволяет карбоксильной группе диссоциировать и повышает комплексообразующую активность. В некоторых случаях гидроксильные ионы конкурируют за ионы металлов и снижают эффективность комплексообразователей. Ионы металлов присутствуют в растворе в виде гидратных комплексов [металл $H_2O]^+$, и скорость разрушения этих комплексов влияет на скорость образования комплексообразователями хелатных соединений. Относительную привлекательность комплексообразователей для различных ионов можно определить, исходя из константы стабильности или константы равновесия (K = [металл комплексообразователь]/[металл] [комплексообразователь]) (см. главу 8). Например, для кальция константа стабильности, выражаемая в виде log K, составляет относительно ЭДТА 10,7, относительно пирофосфата — 5,0, а относительно лимонной кислоты — 3,5 [20]. Когда эта константа K возрастает, то бóльшая часть металла находится в составе комплексов, а меньшая часть — в форме несвязанных ионов (то есть металл в комплексном соединении связан более прочно).

Комплексообразователи не являются антиоксидантами в том смысле, что они не останавливают процесс окисления путем обрыва цепи реакций и не являются поглотителями кислорода. Вместе с тем они являются ценными синергистами антиоксидантной активности, так как удаляют ионы металлов, катализирующие окисление (см. главу 4). При выборе комплексообразователя для усиления синергизма антиоксидантной активности следует учитывать его растворимость. Лимонная кислота и эфиры лимонной кислоты (в концентрации 20–200 мг/кг) в растворе пропиленгликоля солюбилизируются жирами и маслами и таким образом в чисто липидных системах являются эффективными синергистами. С другой стороны, этилендиаминтетраацетат натрия (Na_2ЭДТА) и Na_2Ca-ЭДТА в чисто жировых системах слаборастворимы и не эффективны. Вместе с тем соли ЭДТА в концентрации до 500 мг/кг являются очень эффективными антиоксидантами в таких эмульсионных системах, как салатные дрессинги, майонез и маргарин, так как работают в водной фазе и особенно на поверхности раздела водной и жировой фаз.

Полифосфаты и ЭДТА используются при консервировании морепродуктов в целях предотвращения образования стекловидных кристаллов струвита или смешанной фосфорнокислой соли магния и аммония ($MgNH_4PO_4$ $6H_2O$). В морепродуктах содержится значительное количество ионов магния, которые иногда при хранении консервированных морских продуктов реагируют с фосфатом аммония с образованием кристаллов, которые ошибочно можно принять за бой стекла. Комплексообразователи можно также

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

использовать для образования в морепродуктах хелатных комплексов с железом, медью и цинком, помогающих предотвратить, в частности, реакции с сульфидами, приводящими к изменению цвета продуктов. Добавление комплексообразователей к овощам перед бланшированием может ингибировать индуцируемое металлами изменение цвета, а также вызывать выведение ионов кальция из пектиновых веществ клеточных стенок и тем самым способствовать повышению мягкости продукта.

Помимо того, что лимонная и фосфорная кислоты используются в производстве безалкогольных напитков в качестве подкислителей, они образуют также комплексы с металлами, которые могли бы стимулировать окисление таких вкусоароматических соединений, как терпены, и катализировать реакции, сопровождающиеся изменением цвета. Комплексообразователи также стабилизируют напитки брожения путем связывания меди (свободная медь катализирует окисление полифенольных соединений, которые затем взаимодействуют с белками с образованием стабильного помутнения или мути).

Чрезвычайно высокая способность некоторых веществ к комплексообразованию, в том числе синтетической ЭДТА и натуральной фитиновой кислоты (гексафосфоинозитола)*, позволили предположить, что их чрезмерное использование или присутствие в пищевых продуктах может привести к недостаточности кальция и других катионных минеральных веществ в организме. Для решения этой проблемы концентрации и области применения ЭДТА регламентируются нормативными актами, а в некоторых случаях в пищевые системы специально вносят кальций путем использования Na_2Ca-соли ЭДТА вместо чисто натриевых (Na, Na_2, Na_3 или Na_4 ЭДТА) или кислотных форм. Согласно современным научным представлениям нет оснований для большого беспокойства по поводу применения этих комплексообразователей в пищевых продуктах в разрешенных или нативных количествах, особенно с учетом естественных концентраций в пищевых продуктах кальция и других двухвалентных катионов.

11.6. Антиоксиданты

Когда электроны отщепляются от атома или группы атомов, происходит окисление, но существует и обратная реакция восстановления, при которой происходит присоединение электронов к другому атому или группе атомов. Окислительные реакции могут как включать, так и не включать присоединение атомов кислорода или отнятие атомов водорода от окисляемого вещества. Окислительно-восстановительные реакции широко распространены в биологических системах и в пищевых продуктах, причем некоторые окислительные реакции в пищевых продуктах полезны, а другие могут приводить к вредным эффектам, в том числе к расщеплению липидов (см. главу 4), витаминов (см. главу 7) и красящих веществ (см. главу 9) с соответствующей потерей нутритивной ценности и развитием посторонних вкуса и запаха. Контроль нежелательных окислительных реакций в пищевых продуктах обычно осуществляется применением соответствующих технологических методов и способов упаковки, исключающих присутствие кислорода или предполагающих добавление особых химических соединений.

До появления специальных химических технологий контроля свободнорадикального окисления липидов термин «антиоксидант» применялся ко всем веществам, подавлявшим окислительные реакции независимо от механизма их действия. Так, антиоксидантом считалась аскорбиновая кислота, использовавшаяся для предотвращения ферментативного потемнения поверхностей реза у овощей и фруктов (см. главу 6). Здесь аскорбиновая кислота действует как восстановительный агент путем переноса атомов водорода на хиноны, образующиеся в результате ферментативного окисления фенольных соединений. В замкнутых системах аскорбиновая кислота легко реагирует с кислородом и тем самым выполняет функции его поглотителя. Аналогичным образом сульфиты в пищевых системах легко окисляются до сульфонатов и сульфатов, то есть действуют в сухофруктах как эффективные антиоксиданты (подробнее об этом см. раздел 11.7.1). Наиболее часто используемыми пищевыми антиоксидантами являются фенольные соединения. Позднее термин «пищевые антиоксиданты» зачастую стали использовать применительно к тем соединениям, которые прерывают участвующую в окислении липидов свободнорадикальную цепную реакцию, а также к тем, которые поглощают синглетный кислород, однако этот термин в таком узком смысле лучше не использовать.

* Гексафосфоинозитол в мировой практике в качестве пищевой добавки не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

Для антиоксидантов зачастую характерна непостоянная степень эффективности защиты пищевых систем, причем сочетание разных антоксидантов обычно обеспечивают более полную защиту, чем это можно объяснить простыми аддитивными эффектами [55]. Таким образом, сочетание антиоксидантов иногда характеризуется синергизмом, механизм которого до конца не ясен. Считается, например, что аскорбиновая кислота может восстанавливать фенольные антиоксиданты, поставляя атомы водорода феноксирадикалам, образующимся при передаче фенольными антиоксидантами атомов водорода для цепной реакции окисления липидов. Чтобы обеспечить этот эффект в липидах, аскорбиновая кислота для растворения в жире должна стать менее полярной, что осуществляется путем этерификации жирных кислот с образованием таких соединений, как аскорбилпальмитат.

Окисление липидов стимулируется присутствием ионов переходных металлов, в частности меди и железа, путем каталитического действия (см. главы 4 и 8). Эти металлы-прооксиданты зачастую инактивируются добавлением комплексообразователей типа лимонной кислоты или ЭДТА (см. выше раздел 11.5). В этой роли комплексообразователи обладают синергическим действием, поскольку существенно повышают эффективность фенольных антиоксидантов, однако при использовании по отдельности они как антиоксиданты не эффективны.

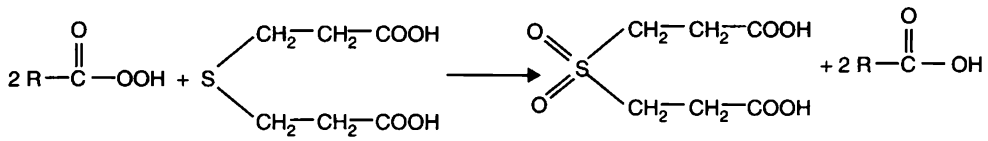
Антиоксидантным действием обладают многие природные вещества, например, широко применяемые токоферолы (см. главу 4). В последнее время в качестве натуральных антиоксидантов широкое промышленное применение нашли содержащие полифенолы экстрактивные вещества специй, в частности, розмарина. Антиоксидантом является и госсипол, который в природе встречается в семенах хлопка, но он токсичен. К другим природным антиоксидантам относятся конифериловый спирт (в растениях), а также гваяконовая и гваяковая кислоты (из смолы гваяка). Все эти соединения структурно родственны бутилгидроксианизолу (*BHA*, БГА), бутилгидрокситолуолу (*BHT*, БГТ), пропилгаллату и ди-*t*-бутилгидрохинону (*TBHQ*, ТБГХ), представляющими собой синтетические фенольные антиоксиданты, разрешенные к применению в составе пищевых продуктов (см. главу 4). Эффективным антиоксидантом является также нордигидрогваяретовая кислота — соединение, родственное некоторым компонентам смолы гваяка, но ее использование непосредственно в пищевых продуктах было запрещено из-за наличия токсических свойств. Все эти фенольные соединения действуют как прерыватели окисления, участвуя в реакциях в виде резонансно стабилизированных свободнорадикальных форм [55], однако считается, что они являются и поглотителями кислорода. С другой стороны, в качестве поглотителя синглетного кислорода β-каротин более эффективен, чем фенольные соединения.

Разрешенными к применению пищевыми антиоксидантами остаются тиодипропионовая кислота и дилаурилтиодипропионат*, несмотря на то что в свое время предполагалось исключить их из списка разрешенных к применению соединений из-за того, что они не нашли широкого применения в пищевых продуктах. Из-за присутствия атома серы в тиодипропионатах высказывалось предположение, что они могут являться причиной появления постороннего вкуса и запаха, но эта точка зрения оказалась неверной. Более убедительной причиной малой распространенности тиодипропионатов является их неспособность в разрешенных концентрациях (до 200 мг/кг) ингибировать окисление липидов, определявшееся по перекисному числу [32]. Классической функцией тиодипропионатов является их применение в качестве вторичных антиоксидантов, когда в высоких концентрациях (более 1000 мг/кг) они разлагают гидропероксиды, образующиеся во время окисления олефина, до относительно стабильных конечных продуктов реакции, и в таком качестве они достаточно эффективны для стабилизации синтетических полифенолов.

Несмотря на то что тиодипропионаты в концентрациях, разрешенных в пищевых продуктах, не эффективны для снижения перекисного числа, они достаточно эффективны для разложения перкислот (надкислот), образующихся в ходе окисления липидов (рис. 11.7) [32]. Надкислоты очень эффективны как посредники при окислении двойных связей с образованием эпоксидных соединений, а в присутствии воды образующиеся эпоксиды легко гидролизуются с образованием диолов. При реакциях с холестерином образуются как эпоксид холестерина, так и производное холестерина — триол, и общепризнанно, что для людей эти оксиды холестерина соответственно потенциально мутагенны и атерогенны [42]. Поскольку тиодипропионаты легко подавляют накопление надкислот, Управление по контролю пищевых продуктов

* В мировой практике в качестве пищевых добавок не применяются. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com



Алкилнадкислота Тиодипропионовая кислота Сульфон тиодипропионовой кислоты Алкилкислота

Рис. 11.7. Механизм распада перкислот при окислении липидов тиодипропионовой кислотой

и лекарственных препаратов США (*FDA*) сохранило за ними статус разрешенных к применению антиоксидантов.

Химическая структура, подобная тиодипропионатам, характерна и для метионина (см. главу 5), и именно она предположительно обусловливает посредством аналогичного механизма некоторые антиоксидантные свойства белков. При реакции сульфида (то есть тиоэфира) с одной надкислотой или гидропероксидом образуется сульфоксид, тогда как при реакции с двумя надкислотами или гидропероксидами образуется сульфон.

11.7. Противомикробные вещества

Важную роль в предотвращении порчи и обеспечении безопасности многих пищевых продуктов играют химические консерванты с антимикробными свойствами, некоторые из которых мы рассмотрим в следующем разделе.

11.7.1. Сульфиты и диоксид серы

Диоксид серы (SO_2) и его производные давно используются в пищевых продуктах как общепринятые консерванты. Их вносят в пищевые продукты для ингибирования процессов неферментативного потемнения, реакций, катализируемых ферментами, для уничтожения и регулирования численности микроорганизмов, а также в качестве антиоксидантов и восстановителей. Как правило, диоксид серы и его производные метаболизируются до сульфата и выводятся с мочой без каких-либо видимых патологий [60], однако из-за недавно обнаруженной сильной реакции на диоксид серы и его производные у некоторых особо чувствительных больных астмой их применение в пищевых продуктах стало специально регулироваться, в том числе и особой маркировкой. Тем не менее в производстве современных пищевых продуктов эти консерванты имеют большое значение.

К наиболее широко применяемым формам этих химических соединений относятся газообразный SO_2, а также сульфиты (SO^{2-}_3), бисульфиты (HSO^-_3) или метабисульфиты ($S_2O^{2-}_5$) натрия, калия или кальция. Чаще всего используют метабисульфиты натрия и калия, поскольку они высокостабильны относительно самоокисления в твердой фазе. Газообразный диоксид серы применяют там, где выщелачивание твердой фазы вызывает проблемы или где газ выполняет функцию кислоты для регулирования значения pH.

Хотя для анионов этих солей по-прежнему широко используются традиционные названия (сульфиты, бисульфиты и метабисульфиты), по номенклатуре *IUPAC* они обозначаются как оксоанионы серы (IV) и называются соответственно сульфитами (SO^{2-}_3), гидрогенсульфитами (HSO^-_3) и дисульфитами ($S_2O^{2-}_5$). Оксокислоты H_2SO_3 и $H_2S_3O_5$ называются соответственно сернистой и двусернистой кислотами [60].

Изменились также широко распространенные представления о поведении сернистой кислоты в водных растворах. Раньше считалось, что при растворении диоксида серы в воде образуется сернистая кислота (H_2SO_3), а соли простых оксоанионов серы (IV) (валентность +4) являются солями этой сернистой кислоты. Вместе с тем доказательств существования свободной сернистой кислоты в водном растворе нет, и по некоторым оценкам на ее долю приходится менее 3% недиссоциированного растворенного SO_2. Растворение SO_2 приводит только к слабым взаимодействиям с водой, в результате которых образуется недиссоциированный комплекс, максимальное содержание которого характерно для значений pH ниже 2. Этот комплекс обозначают как $SO_2 \cdot H_2O$, причем различий между ним и сернистой кислотой обычно не делают (уравнение 11.12) [60].

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

$$SO_2 + H_2O \rightleftarrows SO_2 \quad H_2O \tag{11.12}$$

Поскольку растворы SO_2 высококислотны, а свободная сернистая кислота не обнаруживается, то существует мнение, что в небольших количествах существует сильная кислота — $HSO_2(OH)$, и ее диссоциация ведет к образованию преимущественно бисульфитного иона HSO^-_3, а не иона $SO_2(OH)^-$, доля которого оценивается лишь в 2,5% от всех гидросульфитов (уравнение 11.13). Этот ион HSO^-_3 преобладает в диапазоне значений pH 3–7, а при pH выше 7 преобладает ион SO^{2-}_3 (уравнение 11.14). Значение pK_a для начального этапа диссоциации «сернистой кислоты» составляет 1,86, а для второго этапа — 7,18. В разбавленных растворах HSO^-_3 (10^{-2} М) присутствует небольшое количество ионов метабисульфита (дисульфита), но с увеличением концентрации бисульфита их доля быстро возрастает (уравнение 11.15). Таким образом, относительная доля каждой формы зависит от значения pH раствора, ионной силы оксоформ серы (IV) и концентрации нейтральных солей [60].

$$SO_2 \quad H_2O \rightleftarrows HSO_2(OH) \rightleftarrows HSO^-_3 + H^+ \tag{11.13}$$

$$HSO^-_3 \rightleftarrows H^+ + SO^{2-}_3 \tag{11.14}$$

$$2HSO^-_3 \rightleftarrows S_2O^{2-}_5 + H_2O \tag{11.15}$$

В качестве антимикробного вещества диоксид серы наиболее эффективен в кислой среде, что может быть обусловлено условиями, позволяющими недиссоциированным соединениям проникать через клеточную стенку. Отмечается, что при высоких значениях pH ионы HSO^-_3 обладают бактерицидным, но не антидрожжевым действием. Диоксид серы обладает как биоцидным, таки биостатическим действием, причем он более эффективен для уничтожения бактерий, чем плесеней и дрожжей. Кроме того, он более эффективен относительно грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными.

Считается, что нуклеофильность сульфитного иона обусловливает значительную часть эффективности диоксида серы в качестве антимикробного средства и химического консерванта [61]. Существуют доказательства, что взаимодействие оксоформ серы (IV) с нуклеиновыми кислотами дает биостатический и биоцидный эффекты [60]. К другим механизмам, посредством которых оксоформы серы (IV) подавляют жизнедеятельность микроорганизмов, относятся реакция бисульфита с ацетальдегидом в клетке, восстановление важнейших дисульфидных связей в ферментах и образование дополнительных бисульфитных соединений, препятствующих респираторной активности с участием никотинамиддинуклеотида.

Из известных ингибиторов неферментативного потемнения пищевых продуктов (см. главу 3) диоксид серы является одним из наиболее эффективных. В ингибировании неферментативного потемнения диоксидом серы (рис. 11.8) участвуют различные химические механизмы, к наиболее важным из которых относится реакция оксоанионов серы (IV) (бисульфита) с карбонильными группами редуцирующих сахаров и других участвующих в потемнении соединений. Эти дополнительные обратимые бисульфитные соединения связывают карбонильные группы, замедляя процессы потемнения, но существует и гипотеза об удалении в ходе этой реакции также карбонильных хромофоров из меланоидиновых структур, что приводит к обесцвечиванию красящего вещества. Кроме того, оксоанионы серы (IV) необратимо реагируют с гидроксильными группами сахаров, особенно с находящимися в 4-й позиции. Аскорбиновая кислота в реакциях потемнения является при этом посредником, давая в результате сульфонаты ($R–CHSO^-_3–CH_2–R'$). Образование относительно стабильных сульфонатных производных замедляет общую реакцию и ингибирует те пути метаболизма, по которым чаще всего образуются окрашенные соединения [60].

Диоксид серы также ингибирует некоторые катализируемые ферментами реакции, а именно реакции ферментативного потемнения, имеющее большое значение в консервировании пищевых продуктов. Образование коричневых пигментов путем катализируемого ферментами окисления фенольных соединений может привести к серьезным проблемам с качеством при переработке некоторых свежих овощей и фруктов (см. главу 6), однако опрыскивание сырья сульфитами или метабисульфитами или его обработка погружением в раствор с лимонной кислотой позволяет эффективно контролировать ферментативное потемнение предварительно очищенных и нарезанных картофеля, моркови и яблок.

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

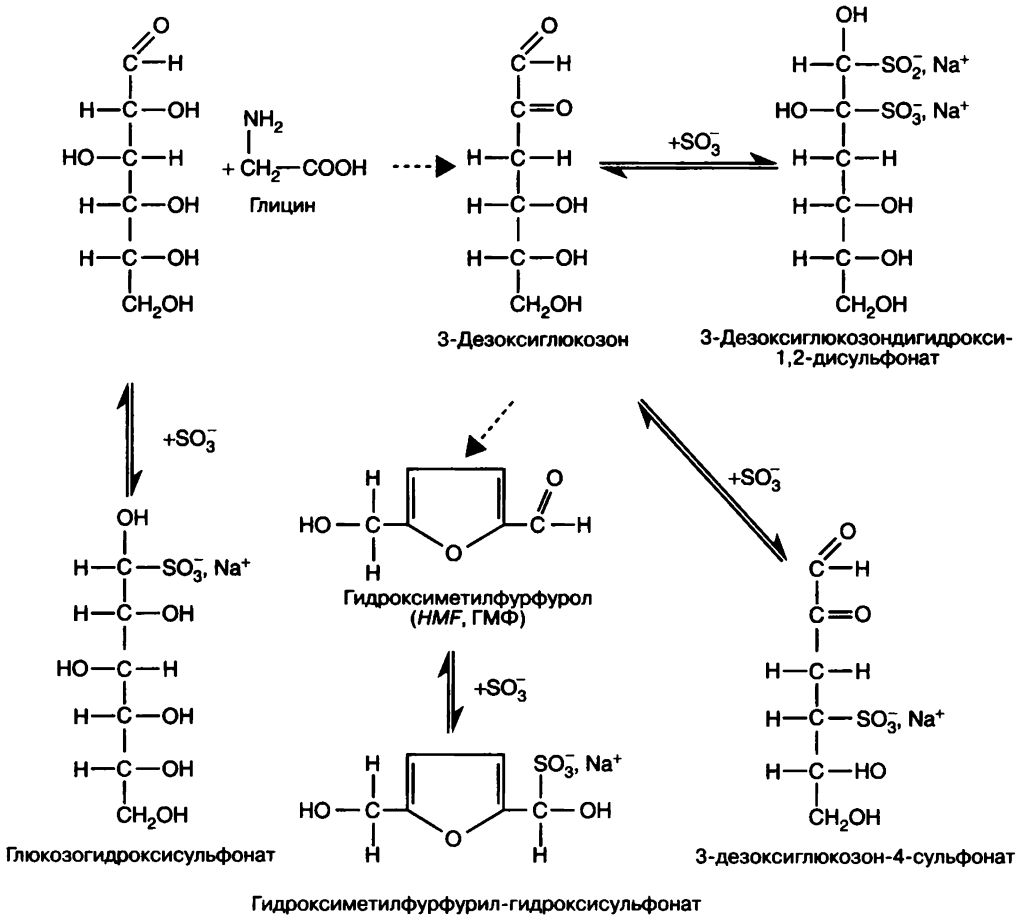


Рис. 11.8. Механизмы ингибирования неферментативного потемнения (реакций Майяра) некоторыми оксоанионами серы (IV) — бисульфитом и сульфитом

Диоксид серы в некоторых пищевых системах обладает также антиоксидантным действием, но в этих целях его, как правило, не используют. При внесении диоксида серы в пиво существенно подавляется развитие окисленного привкуса при хранении. Кроме того, в присутствии диоксида серы эффективно сохраняется красный цвет свежего мяса, но такое его использование запрещено из-за возможной маскировки проявлений порчи мясных продуктов.

Внесение диоксида серы в тесто из пшеничной муки вызывает в белках обратимое расщепление дисульфидных связей. В производстве печенья добавление бисульфита натрия сокращает время замеса и уменьшает эластичность теста, что облегчает резку пластов, а также уменьшает различия, обусловленные разными партиями муки [60]. Обработку газообразным диоксидом серы зачастую применяют перед сушкой фруктов, иногда в присутствии буферных веществ (например, $NaHCO_3$). Такая обработка предотвращает потемнение и индуцирует обратимое обесцвечивание антоцианиновых пигментов. Такие свойства желательны, например, в полуфабрикатах для изготовления белых вин и вишни мараскино (коктейльной вишни). Содержание диоксида серы в сухофруктах сразу после обработки иногда достигает 2000 мг/кг, хотя в большинстве других пищевых продуктах он содержится гораздо в более низких количествах, так как его содержание выше 500 мг/кг обусловливает заметные неприятные побочные привкусы; кроме того, сульфиты имеют тенденцию улетучиваться и/или вступать в реакции при хранении и кулинарной обработке.

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.7.2. Соли азотной и азотистой кислот

Натриевая и калиевая соли азотной и азотистой кислот широко используются в посолочных смесях для мясных продуктов в целях формирования и закрепления цвета, ингибирования жизнедеятельности микроорганизмов и создания характерного вкуса и аромата [50]. Функциональным компонентом здесь является, по всей видимости, скорее нитрит, чем нитрат. Нитриты мяса дают окись азота, которая вступает в реакцию с гемовыми соединениями с образованием нитрозомиоглобина — пигмента, обусловливающего розовый цвет консервированного мяса (см. главу 9). Данные органолептического анализа свидетельствуют, что нитриты участвуют в формировании вкуса консервированного мяса, выполняя по всей видимости роль антиоксиданта, но особенности этих химических реакций изучены еще недостаточно [46]. Кроме того, нитриты при содержании 150–200 мг/кг подавляют развитие клостридий в консервированном мясном фарше и соленых мясных продуктах. В этом отношении нитрит более эффективен при значениях pH 5,0–5,5, чем при более высоких значениях. Особенности антимикробной эффективности нитрита до конца не ясны, но предполгается, что нитрит реагирует с сульфгидрильными группами с образованием соединений, которые в анаэробных условиях микроорганизмами не метаболизируются.

Показано, что в определенных видах посоленного мяса нитриты участвуют в образовании низких, но возможно токсичных концентраций нитрозаминов (о химии нитрозаминов и их последствиях для здоровья человека см. главу 12). Соли азотной кислоты (нитраты) нативно присутствуют в составе многих пищевых продуктов, в том числе в овощах, особенно в шпинате. Накопление больших количеств нитрата в тканях растений, возделываемых на сильно удобренных почвах, вызывает определенное беспокойство (особенно в продуктах детского питания из этого растительного сырья). Восстановление нитрата до нитрита в кишечнике с последующим всасыванием может привести к цианозу из-за образования метмиоглобина. По этим причинам возможность использования нитритов и нитратов в производстве пищевых продуктах ставится под вопрос. Противомикробная активность нитрита дает основания для его применения в консервировании мяса, особенно при возможности роста и размножения *C. botulinum*. При этом в производстве тех консервированных продуктов, у которых отсутствует риск ботулизма, серьезных оснований для внесения нитратов и нитритов нет.

11.7.3. Уксусная кислота

Консервирование продуктов уксусной кислотой (CH_3COOH) в виде пищевого уксуса известно с античных времен. Наряду с пищевым уксусом (4%-ный водный раствор уксусной кислоты) и уксусной кислотой используют также ацетат натрия (CH_3COONa), ацетат калия (CH_3COOK), ацетат кальция [$(CH_3–COO)_2Ca$] и диацетат натрия ($CH_3–COONa$ $CH_3–COOH$ $1/2H_2O$). Эти соли используют в производстве хлебобулочных изделий (0,1–0,4%) для предотвращения картофельной болезни и роста плесеней, причем они не влияют на дрожжи [8]. Уксус и уксусную кислоту используют также в производстве маринованных мясных и рыбных продуктов. В присутствии сбраживаемых углеводов для предотвращения роста и размножения молочнокислых бактерий и дрожжей необходимо не менее 3,6% кислоты. Уксусную кислоту применяют и в таких пищевых продуктах, как кетчуп, майонез и соленья, где она выполняет двойную функцию — подавляет рост микроорганизмов и участвует в формировании вкуса и аромата. Антимикробная активность уксусной кислоты возрастает с понижением pH, что характерно и для других алифатических жирных кислот.

11.7.4. Пропионовая кислота

Пропионовая кислота ($CH_3–CH_2–COOH$) и ее натриевая и кальциевая соли обладают противоплесневой активностью и бактерицидным действием относительно некоторых бактерий. Это соединение нативно присутствует в швейцарском сыре (до 1 %масс.), в котором оно продуцируется микроорганизмами *Propionibacterium shermanii* [8]. Пропионовая кислота нашла широкое применение в хлебопечении, где она не только эффективно подавляет развитие плесеней, но и ингибирует жизнедеятельность *Bacillus mesentericus*, вызывающих картофельную болезнь хлеба. Используемые концентрации обычно варьируют до 0,3 %масс. Как и в случае других антимикробных карбоновых кислот, активной является недиссоциированная форма пропионовой кислоты, причем в большинстве областей применения — в диапазоне pH до 5,0. Токсичность пропионовой кислоты для плесеней и некоторых бактерий обусловлена неспособно-

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

стью этих микроорганизмов метаболизировать ее трехуглеродный каркас. У млекопитающих пропионовая кислота метаболизируется так же, как и другие жирные кислоты, причем в концентрациях, характерных для пищевых продуктов, она не дает каких-либо токсических эффектов.

11.7.5. Сорбиновая кислота и другие кислоты со средней длиной цепи

Монокарбоновые алифатические жирные кислоты со средней и большей длиной цепи обладают противомикробной и особенно противогрибковой активностью, причем особенно эффективны аналоги α-ненасыщенных жирных кислот. Сорбиновая кислота (C–C=C–C=C–COOH) и ее натриевые и калиевые соли широко используются для подавления жизнедеятельности плесеней и дрожжей в широком ассортименте пищевых продуктов, в том числе в сыре, хлебобулочных изделиях, фруктовых соках, вине и соленьях. В природе больше всего сорбиновой кислоты в ягодах рябины. Промышленно выпускаемые соли сорбиновой кислоты, используемые в пищевой промышленности, синтезируют; состоят они преимущественно из *транс*-изомеров жирной кислоты. Поскольку сорбиновая кислота химически является жировым соединением, ее использование необходимо отмечать в маркировке как вносящее вклад в содержание *транс*-изомеров жирных кислот.

Сорбиновая кислота особенно эффективна в предотвращении роста плесеней, причем в используемых концентрациях (до 0,3 %масс.) она дает небольшой посторонний привкус. Вносят ее как непосредственно, так и в составе защитных покрытий или упаковочных материалов. С понижением значения pH активность сорбиновой кислоты возрастает, что свидетельствует о более высокой ингибирующей способности недиссоциированной формы по сравнению с диссоциированной. Обычно сорбиновая кислота эффективна вплоть до значения pH 6,5, что значительно выше, чем эффективный диапазоны пропионовой и бензойной кислот.

Противогрибковое действие сорбиновой кислоты обусловлено, по-видимому, тем, что плесени неспособны метаболизировать α-ненасыщенную диеновую систему ее алифатической цепи. Предполагается, что диеновая структура сорбиновой кислоты мешает клеточной дегидрогеназе дегидратировать жирные кислоты на первой ступени окисления.

Насыщенные жирные кислоты (C_2–C_{12}) также обладают средней способностью подавлять рост многих плесеней, в том числе *Penicillium roqueforti*. Вместе с тем, некоторые из этих плесеней участвуют в β-окислении насыщенных жирных кислот до соответствующих β-кетокислот, особенно если концентрация кислоты находится на уровне минимального ингибирования. При декарбоксилировании продуцируемой β-кетокислоты образуется соответствующий метилкетон (рис. 11.9), который обладает противомикробными свойствами. С другой стороны, этот механизм образования метилкетонов обусловливает характерный вкус и аромат голубых сыров, созревающих с участием плесени. Показано, что некоторые плесени способны метаболизировать сорбиновую кислоту, и существует гипотеза, что такая биотрансформация происходит путем β-окисления (подобно тому, как это происходит у млекопитающих). Все это свидетельствует, что животные и люди метаболизируют сорбиновую кислоту аналогично метаболизации натуральных жирных кислот.

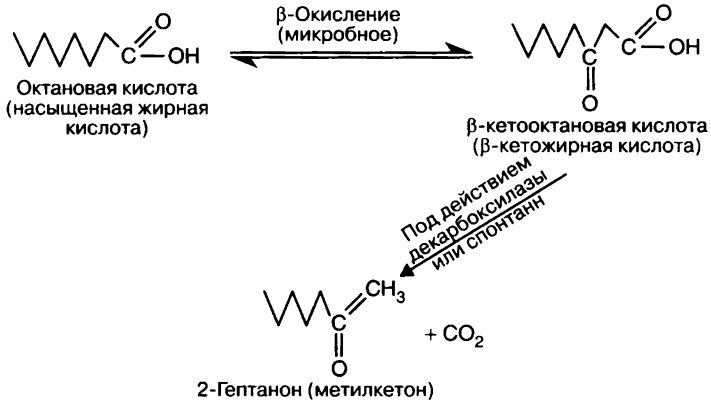


Рис. 11.9. Детоксикация жирной кислоты (октановой) путем β-окисления с участием плесени и последующего декарбоксилирования с образованием метилкетона (гептанона)

Хотя сорбиновая кислота на первый взгляд кажется весьма стабильной и нереактивной, в пищевых продуктах она зачастую претерпевает изменения, обусловленные действием микроорганизмов или присутствующих химических веществ. Два механизма деактивации противомикробных свойств сорбиновой кислоты приведены на рис. 11.10. Один механизм (рис. 11.10, *а*) характерен для плесеней, в частности, для *P. roqueforti,* и включает декарбоксилиро-

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.: (495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

вание непосредственно сорбиновой кислоты, в результате чего образуется 1,3-пентадиен (углеводород). Когда в пищевых продуктах, содержащих сорбиновую кислоту, происходит рост плесени (в частности, на поверхности сыра, обработанного сорбатом), интенсивный запах этого летучего соединения может восприниматься как посторонний запах углеводородов («бензиновый»).

Если вино, содержащее сорбиновую кислоту, подвергается в бутылке порче молочнокислыми бактериями, то развивается посторонний гераниевый запах [11]. Молочнокислые бактерии восстанавливают сорбиновую кислоту до сорбилового спирта (рис. 11.10, *b*) с последующим образованием этоксилированного гексадиена с отчетливым, легко узнаваемым запахом листьев герани.

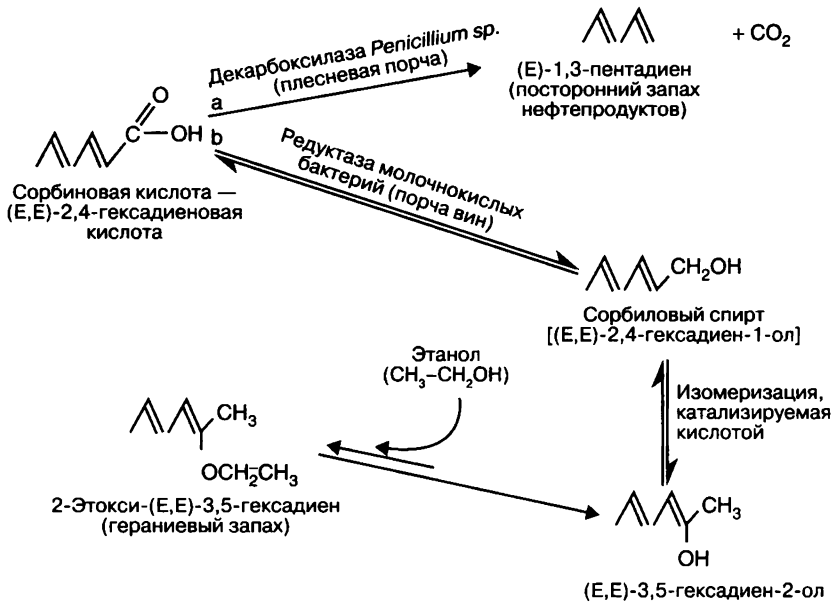


Рис. 11.10. Ферментативные реакции, ухудшающие противомикробные свойства сорбиновой кислоты: *a* — декарбоксилирование под действием *Penicillium* sp.; *b* — образование в вине этоксилированного диенового углеводорода в результате восстановления карбоксильной группы с последующей перегруппировкой и образованием эфира

Сорбиновую кислоту иногда используют в сочетании с диоксидом серы, что приводит к реакциям, истощающим и сорбиновую кислоту, и оксоанионы серы (IV) (рис. 11.11) [23]. В аэробных условиях, особенно на свету, образуются радикалы SO^-_3, которые сульфитируют олефиновые связи, а также способствуют окислению сорбиновой кислоты. На эту реакцию, затрагивающую исключительно сорбиновую кислоту, не оказывает заметного влияния присутствие обычных антиоксидантов, и поэтому хранящиеся в аэробных условиях пищевые продукты, содержащие диоксид серы и сорбиновую кислоту, очень чувствительны к самоокислению. В анаэробных условиях сочетание сорбиновой кислоты и диоксида серы вызывает гораздо более медленную нуклеофильную реакцию сульфитного иона (SO^-_3) с диеном (1,4-присоединение) сорбиновой кислоты с образованием 5-сульфо-3-гексеновой кислоты (рис. 11.11).

При использовании сорбиновой кислоты в таких изделиях, как тесто из пшеничной муки, белки которых содержат соответствующие количества окисленных или восстановленных тиоловых групп (соответственно, R–S–S–R в цистине и R–SH в цистеине), происходят реакции между сорбиновой кислотой и белками. Тиоловые группы (R–SH) диссоциируют на ионы ($R–S^-$), являющиеся активными нуклеофилами и вступающие в реакцию главным образом через 1,6-присоединения к сопряженному (конъюгированному) диену сорбиновой кислоты. В этой реакции, протекающей при более высоких значениях pH (> 5) и температуры, белок связывается с сорбиновой кислотой (например, в ходе выпечки). В очень кислых условиях (pH < 1) эта реакция обратима, но при более высоких значениях pH результатом является утрата сорбиновой кислотой своего антисептического действия [33].

В качестве противогрибковых средств широкое распространение получили сорбиновая кислота и сорбат калия, но позднее было показано, что сорбат обладает более широким антимикробным действием, распространяющимся на

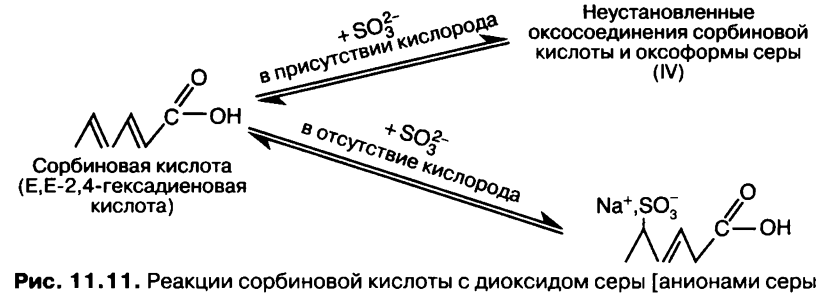


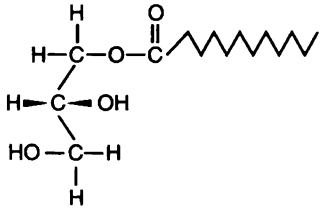
Рис. 11.11. Реакции сорбиновой кислоты с диоксидом серы [анионами серы (IV)]

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.: (495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

дрожжи и многие виды бактерий порчи свежего мяса, рыбы и мяса птицы. Особенно эффективен сорбат для ингибирования токсикогенеза *C. botulinum* в беконе и охлажденной свежей рыбе в РГС-упаковке.

11.7.6. Глицериловые эфиры

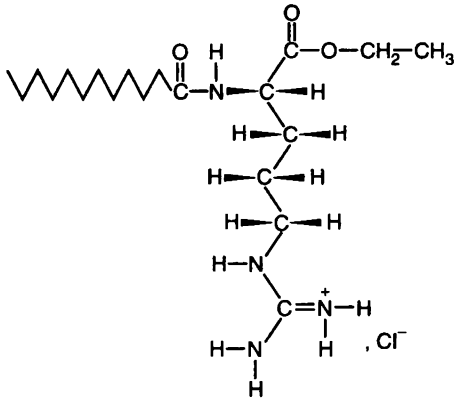
Многие жирные кислоты и моноглицериды обладают выраженной антимикробной активностью относительно грамположительных бактерий и некоторых видов дрожжей [31]. Ненасыщенные жирные кислоты, особенно с 18-ю атомами углерода, высоко активны как жирные кислоты, тогда как кислоты со средней длиной цепи (до 12 атомов углерода) проявляют более сильные ингибирующие свойства при их этерификации с глицерином. Глицерилмонолаурат, известный под торговой маркой «Монолаурин», в концентрациях 15–250 мг/кг ингибирует рост и размножение некоторых потенциально патогенных стафилококков и стрептококков. Его широко применяют в косметических средствах, а благодаря своей липидной природе он может использоваться и в производстве некоторых пищевых продуктов*. Липофильные соединения такого рода также обладают антибактериальной активностью относительно *C. botulinum*, так что глицерилмонолаурат может найти применение в консервировании мясных продуктов и в производстве охлажденной расфасованной свежей рыбы. Ингибирующее действие липофильных производных глицеридов связано, очевидно, с их способностью облегчать перенос протонов через клеточные мембраны [18]. Лизис клеток наблюдается только при высоких концентрациях этих соединений и происходит, по-видимому, из-за образования «дыр» в клеточных мембранах.



Структура монолаурина

11.7.7. Аргинат лауриновой кислоты

Аргинат лауриновой кислоты (этил-N-додеканоил-*L*-аргината гидрохлорид), недавно появившийся в продаже противомикробный препарат**, так же, как и глицерилмонолаурат, содержит молекулу жирной кислоты со средней длиной цепи. Он имеет подтвержденный статус *GRAS* и обладает широким спектром антимикробной активности, что может быть полезным для контроля пищевых патогенов (*Campylobacter, Salmonella, Clostridium, Escherichia* и *Staphylococcus*). Его действие связано с разрушением липидного бислоя плазматической мембраны, что препятствует ходу метаболических процессов и осуществлению цикла деления клеток [3].



Аргинат лауриновой кислоты

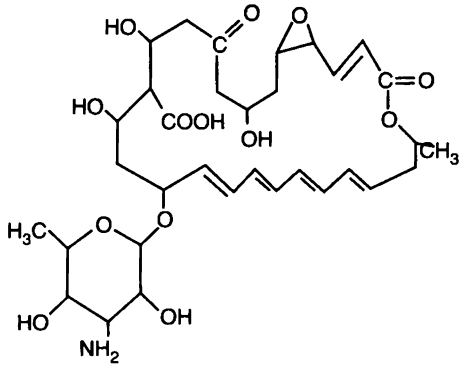
* В мировой практике глицерилмонолаурат в качестве пищевой добавки не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

** В мировой практике в качестве пищевой добавки не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.7.8. Натамицин

Натамицин или пимарицин (номер в международном химическом реестре *Chemical Abstracts Servises — CAS* № 768-93-8) является полиеновым макролидным антибиотиком, разрешенным в США к применению в производстве зрелых сыров в качестве противоплесневого препарата.



Натамицин

Этот ингибитор плесеней высокоэффективен на поверхностях пищевых продуктов, контактирующих с воздухом, где обычно и растут плесени. Считается, что механизм действия натамицина является результатом связывания натамицина с молекулами стерина клеточных мембран грибов, что изменяет их проницаемость и тем самым приводит к нарушению клеточных процессов. Натамицин особенно привлекателен для использования в продуктах брожения, особенно зрелых сырах, поскольку он селективно подавляет рост плесеней, одновременно обеспечивая возможность нормального роста и метаболизма бактерий, участвующих в созревании.

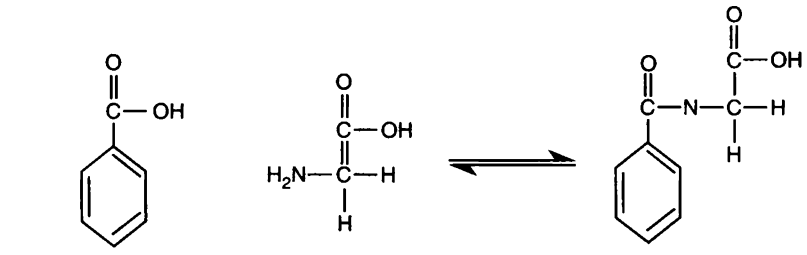
11.7.9. Бензойная кислота

Бензойная кислота (C_6H_5COOH) нашла широкое применение в производстве пищевых продуктов как антимикробное вещество [5]. В природе она встречается в клюкве, черносливе, корице и гвоздике. Недиссоциированная форма этой кислоты обладает противомикробной активностью, причем оптимальная активность проявляется в диапазоне pH 2,5–4,0, что делает ее удобной для использования в таких кислых напитках и продуктах, как фруктовые соки*, газированные напитки, маринованные и соленые огурцы, а также квашеная капуста. В пищевых продуктах со значениями pH выше 5,2–5,5 бензоаты характеризуются очень небольшой противомикробной активностью. Обычно используют натриевые и калиевые соли бензойной кислоты, так как они легче диспергируются в продуктах на водной основе, чем собственно кислотная форма. При попадании в соответствующий кислый продукт большая часть соли бензойной кислоты превращается в активную протонированную форму, наиболее эффективную относительно дрожжей и бактерий и менее эффективную относительно плесеней. Зачастую бензойную кислоту используют в сочетании с сорбиновой кислотой или парабенами, при этом диапазон концентраций обычно составляет 0,05–0,1% масс.

Особенности противомикробной активности бензойной кислоты до конца не ясны, однако считается, что липофильный характер протонированной бензойной кислоты облегчает проникновение молекулы через клеточные мембраны во внутриклеточное пространство. Экспериментальные данные свидетельствуют, что в зависимости от типа микроорганизма у нее могут быть разные формы активности, включая как устранение протонных сил, так и ингибирование важнейших для метаболизма ферментов. Показано, что бензойная кислота в небольших количествах не оказывает на человека вредного воздействия и легко выводится из организма (в основном после ковалентного связывания с глицином, рис. 11.12), образуя гиппуровую кислоту (бензоилглицин), что предотвращает накопление бензойной кислоты в организме.

* В производстве фруктовых соков бензойная кислота и ее соли не применяются. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

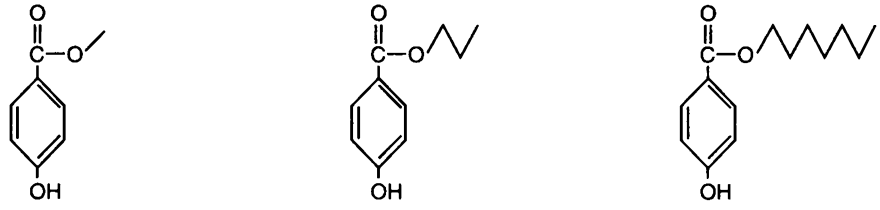


Бензойная кислота Глицин Гиппуровая кислота

Рис. 11.12. Метаболическое связывание бензойной кислоты (консерванта) с глицином, облегчающее ее выведение из организма

11.7.10. Парабены

Парабены — это алкиловые эфиры *пара*-гидроксибензойной кислоты, широко применяющейся в качестве противомикробного вещества в производстве пищевых продуктов, фармацевтических препаратов и косметических средств. На рынке США используются метиловый, пропиловый и гептиловый эфиры, а в некоторых других странах используются также этиловый и бутиловый эфиры*.



Метиловый парабен (Метил-*пара*-гидроксибензоат) Пропиловый парабен (Пропил-*пара*-гидроксибензоат) Гептиловый парабен (Гептил-*пара*-гидроксибензоат)

Парабены используются в качестве противомикробных средств в хлебобулочных изделиях, безалкогольных напитках, пиве, оливках, маринованных продуктах, джемах, желе и сиропах** Значительного влияния на вкус и аромат они не оказывают и являются эффективными ингибиторами роста и размножения дрожжей и плесеней (в концентрации 0,05–0,1 %масс.). Относительно бактерий, особенно грамотрицательных, они неэффективны [8]. С увеличением длины алкильной цепи антимикробная активность парабенов возрастает, а их растворимость в воде снижается. Более низкомолекулярные парабены во многих случаях используют благодаря их характеристикам растворимости. В отличие от других противогрибковых веществ, парабены активны при pH 7 и выше (очевидно, благодаря их способности не диссоциироваться при этих значениях pH). Фенольная группа придает молекуле характер слабой кислоты. Эфирная связь устойчива к гидролизу даже при температурах стерилизации. Свойства парабенов во многом сходны со свойствами бензойной кислоты, и зачастую их используют в сочетании. Парабены мало токсичны для людей и после гидролиза эфирной группы и последующего метаболического связывания выводятся из организма с мочой.

* В Европе и РФ разрешены к применению только метиловые и этиловые эфиры *пара*-гидроксибензойной кислоты и их натриевые соли. — *Примеч. науч. ред.*

** В Европе и РФ применение парабенов ограничено производством следующих продуктов: желе, покрывающие мясные продукты; сухие завтраки и закуски на основе злаковых и картофеля, покрытые орехами; сахаристые кондитерские изделия, конфеты, шоколад с начинкой. Допускается их применение при поверхностной обработке вяленых мясных продуктов. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.7.11. Эпоксиды

Большинство используемых в производстве пищевых продуктах антимикробных веществ в применяемых концентрациях характеризуются не летальным, а ингибирующим действием, но существуют исключения, касающиеся оксидов этилена и пропилена.



Этиленоксид Пропиленоксид

Эти химические стерилизаторы используют в переработке некоторых пищевых продуктов с низким содержанием влаги* и для стерилизации асептических упаковочных материалов. Для обеспечения лучшего контакта с микроорганизмами эпоксиды используют в парообразном состоянии, и через некоторое время большинство остаточных непрореагировавших эпоксидов удаляют путем струйной промывки и вакуумирования.

Эпоксиды представляют собой химически активные циклические эфиры, уничтожающие все микроорганизмы, в том числе споры и вирусы, но механизм их действия изучен еще не достаточно. Что касается этиленоксида, то было высказано предположение, что причиной летальности микроорганизмов может быть алкилирование важных промежуточных метаболитов с гидроксильной этиловой группой ($-CH_2-CH_2-OH$) [8]. В системе метаболизма атаке при этом может подвергаться сайт любого подвижного водорода. Эпоксиды также реагируют с водой с образованием соответствующих гликолей (рис. 11.13), однако последние низкотоксичны и поэтому не могут оказывать ингибирующего действия.

Поскольку большая часть активного эпоксида из переработанного пищевого продукта удаляется, а образовавшиеся гликоли низкотоксичны, может показаться, что эти газообразные стерилизующие вещества могут широко применяться, однако их использование ограничено такими сухими изделиями, как ореховая масса и специи (при реакции с водой концентрация эпоксидов в скоропортящихся продуктах быстро снижается). Специи зачастую вносятся в скоропортящиеся пищевые продукты и характеризуются высокой обсемененностью микроорганизмами. Термическая стерилизация специй неприемлема из-за летучести важных вкусоароматических соединений и небольшой, как правило, термостойкости продукта, так что обработка эпоксидами является хорошим способом снижения микробной нагрузки.

Возможное образование относительно токсичных хлоргидринов при реакции между эпоксидами и неорганическими хлоридами (см. рис. 11.13) является предметом некоторого беспокойства, однако существуют данные, что в низких концентрациях пищевые хлоргидрины не оказывают вредного воздействия [62]. Другими факторами использования эпоксидов, которые следует учитывать, являются их возможно неблагоприятное воздействие на витамины, в том числе на рибофлавин, ниацин и пиридоксин.

Этиленоксид (точка кипения 13,2 °С) более реакционноспособен, чем пропиленоксид; он также более летуч и горюч. В целях безопасности этиленоксид зачастую поставляют в виде смеси из 10% этиленоксида и 90% диоксида углерода. Стрелизуемый продукт помещают в закрытую камеру, из которой откачивают воздух, после чего в ней создается давление до 30 фунтов с использованием смеси этиленоксида с диоксидом углерода. Это давление необходимо для обеспечения концентрации эпоксида, достаточной для гибели микроорганизмов за разумный период времени. При использовании пропиленоксида (точка кипения 34,3 °С) для поддержания эпоксида в газообразном состоянии следует применять соответствующее нагревание.

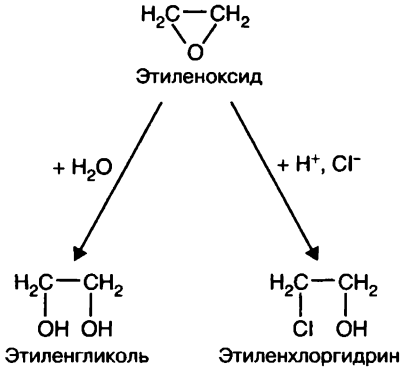


Рис. 11.13. Реакции этиленоксида с водой и ионом хлора

* В мировой практике в качестве консервантов не применяются. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.7.12. Антибиотики

Большую группу противомикробных средств составляют антибиотики, нативно продуцируемые многими микроорганизмами и обладающие селективной противомикробной активностью. В медицине антибиотики применяются уже давно, и их успех в деле контроля патогенных микроорганизмов у живых млекопитающих обусловил начало широких исследований в области возможного применения антибиотиков в консервировании пищевых продуктов. Вместе с тем из опасений, что регулярное использование антибиотиков может привести к появлению резистентных штаммов микроорганизмов, их применение в пищевых продуктах в США в настоящее время не разрешено (за исключением низина). Появление резистентных штаммов микроорганизмов имело бы особо важное значение, если бы антибиотик, используемый в составе пищевого продукта, использовался бы и как лекарство.

Низин (полипептидный антибиотик) продуцируется молочнокислыми стрептококками, и в настоящее время он разрешен в США к применению в продуктах с высоким содержанием влаги на основе плавленых сыров, где он используется для предотвращения возможного роста и размножения *C. botulinum*. Низин всесторонне исследовался на возможность его применения для консервирования пищевых продуктов — он активен относительно грамположительных микроорганизмов, особенно для ингибрования прорастания спор [49], и в медицине не используется. В других странах низин используется также для предотвращения порчи таких молочных продуктов, как плавленые сыры и сгущенное молоко. Относительно грамотрицательных микроорганизмов порчи низин не эффективен; кроме того, стойкостью к нему обладают некоторые штаммы клостридий. Для людей низин фактически нетоксичен, не вызывает привыкания к медицинским антибиотикам и безвредно разлагается в кишечнике.

В некоторых странах допускается ограниченное использование относительно небольшого числа других антибиотиков — хлортетрациклина и окситетрациклина [8]*. Большинство существующих или предполагаемых областей их применения в пищевых продуктах относятся к их использованию в качестве вспомогательных средств наряду с другими способами консервирования, в том числе для замедления порчи охлажденных скоропортящихся продуктов и снижения жесткости режимов тепловой обработки. К группе скоропортящихся продуктов, для которых антибиотики широкого спектра действия могут оказаться полезными, относятся свежее мясо, рыба и мясо птицы. Несколько лет назад *FDA* разрешило обрабатывать тушки птицы путем погружения в растворы хлортетрациклина или окситетрациклина, что увеличило срок хранения мяса птицы (остаточное содержание антибиотиков при обычных способах кулинарной обработки снижается до нуля).

Биохимические аспекты действия антибиотиков стали исследоваться сравнительно недавно, причем особое внимание уделяется молекулярным механизмам. При этом продолжается непрерывный поиск натуральных консервантов, пригодных для использования в производстве пищевых продуктов, но поиск таких веществ затрудняется из-за предъявляемых к ним жестких требований.

11.7.13. Диэтилпирокарбонат

Диэтилпирокарбонат применяется в качестве противомикробного добавки в производстве напитков — прежде всего фруктовых соков, вина и пива**. Преимущество диэтилпирокарбоната заключается в том, что его можно использовать при холодной пастеризации водных растворов, после чего он легко гидролизуется до этанола и диоксида углерода (рис. 11.14). Внесение диэтилпирокарбоната в кислые напитки (pH < 4,0) в количестве 120–300 мг/дм^3 приводит к полному уничтожению дрожжей примерно за 60 мин. Другие микроорганизмы, в том числе молочнокислые бактерии, более стойки, и стерилизация достигается только в условиях низкой микробной нагрузки (< 500 КОЕ/мл) и pH < 4,0. Такое низкое значение pH замедляет скорость расщепления диэтилпирокарбоната и повышает его эффективность.

Концентрированный диэтилпирокарбонат раздражает слизистые оболочки, однако поскольку гидролиз завершается в течение 24 ч, оснований для беспокойства по поводу его токсичности нет. К сожалению, диэтилпирокарбонат вступает в реакции со многими соединениями с образованием карбэтокси-производных

---

* В РФ их применение не разрешено. — *Примеч. науч. ред.*

** В мировой практике диэтилпирокарбонат в качестве пищевой добавки не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

и этиловых эфиров. В частности, диэтилпирокарбонат легко вступает в реакцию с аммиаком с образованием уретана (этилкарбамата, см. рис. 11.14). Эту реакцию считали ответственной за присутствие в продуктах, обработанных диэтилпирокарбонатом, уретана, обладающего канцерогенными свойствами, и в 1972 г. использование диэтилпирокарбоната запретили. Поскольку аммиак широко распространен в растительных и животных тканях, разумно предположить, что пищевые продукты, обработанные диэтилпирокарбонатом, вполне могут содержать некоторое количество уретана.

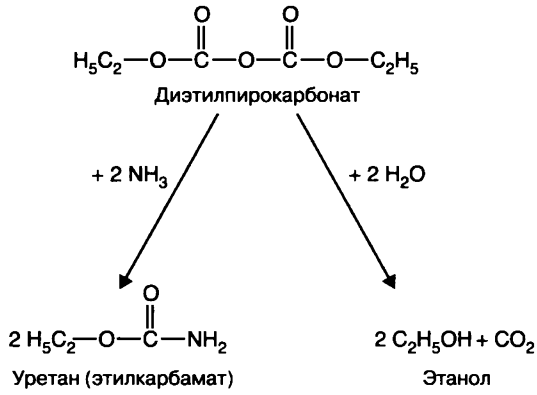


Рис. 11.14. Реакции гидролиза и амидизации диэтилпирокарбоната

Тем не менее позднее было показано, что присутствие уретана характерно для ферментированных пищевых продуктов и напитков брожения. Обычно его содержание в большинстве ферментированных продуктов, включая хлебобулочные изделия, вино и пиво, составляет менее 10 мкг/кг [26]. Был сделан вывод, что основным метаболическим путем его образования в этих продуктах является взаимодействие образующейся в результате метаболизма аргинина мочевины с этанолом. В алкогольных напитках уретан присутствует в значительно более высоких концентрациях, чем в безалкогольных, — по некоторым данным, в бренди из косточковых плодов содержание уретана составляет до 10 мг/дм^3. Несмотря на эти примеры нативного присутствия уретана, в США внесение диэтилпирокарбоната в пищевые продукты запрещено из-за возможности повышения содержания в них канцерогенного уретана.

11.8. Интенсивные низкокалорийные подсластители

К низкокалорийным подслащивающим веществам относится широкая группа веществ, которые обусловливают сладость или усиливают ее ощущение (см. главу 10). Запрет на использование в США цикламатов наряду с вопросами по поводу безопасности сахарина, инициировал интенсивный поиск альтернативных низкокалорийных подсластителей, способных удовлетворить спрос на низкокалорийные пищевые продукты и напитки. В результате были получены многие новых подсластители, и количество конкурентоспособных, потенциально полезных с коммерческой точки зрения низкокалорийных подсластителей продолжает увеличиваться. Относительная степень сладости некоторых таких веществ приведена в табл. 11.3.

Таблица 11.3
Относительная сладость некоторых интенсивных подсластителей

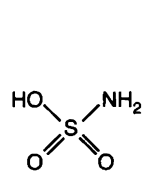
Подслащивающее вещество	Относительная сладость [a] (сахароза = 1)
Ацесульфам К	200
Алитам (в Европе и РФ не применяется)	2,000
Аспартам	180–200
Цикламат	30
Глицирризин	50–100
Монеллин (в мировой практике не применяется)	3000
Неогесперидин дигидрохалкон (НГДХ)	1600–2000
Неотам	7000–13 000
Сахарин	300–400
Стевиозид	300
Сукралоза	600–800
Тауматин	1600–2000

[a] Приведены типичные значения относительной сладости, однако на фактические значения относительной сладости могут сильно влиять концентрация и матрикс пищевого продукта или напитка.

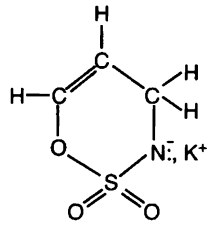
BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.8.1. Сульфоамиды — цикламат, сахарин и ацесульфам К

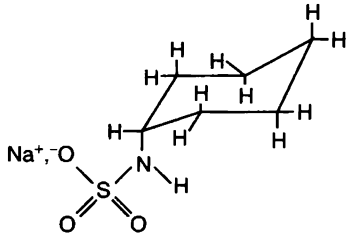
Сульфоамидные подсластители структурно родственны из-за наличия группы сульфаминовой кислоты. К промышленно выпускаемым подсластителям этого типа относятся ацесульфам К, цикламат и сахарин.



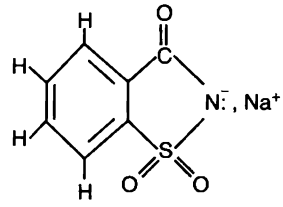
Сульфаминовая кислота



Ацесульфам К



Цикламат натрия (Натрий-*N*-циклогексилсульфамат)



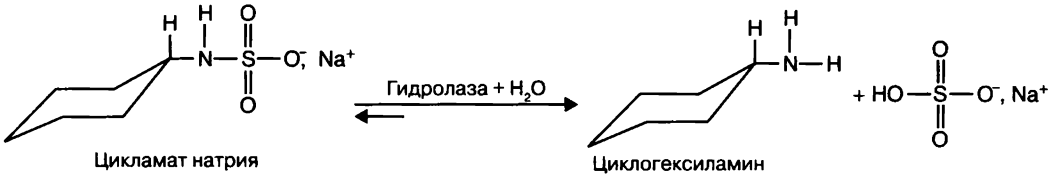
Сахаринат натрия

Цикламат (циклогексилсульфаминовая кислота; цикламиновая кислота) был разрешен в США к применению в качестве пищевой добавки в 1949 г. и до запрещения в конце 1969 г. его натриевая и кальциевая соли и кислотная форма в виде цикламиновой кислоты широко применялись в качестве подсластителей. Цикламаты примерно в 30 раз слаще сахарозы, их вкус подобен вкусу сахарозы без посторонних привкусов, и они термостойки. Сладость цикламатов проявляется медленно и сохраняется дольше, чем у сахарозы.

Некоторые экспериментальные данные, полученные на грызунах, позволили прийти к выводу, что цикламат и продукт его гидролиза — циклогексиламин (рис. 11.15) вызывают рак мочевого пузыря [5, 45].

Проведенное впоследствии широкомасштабное исследование это тестирование не подтвердило, и в США последовали обращения относительно восстановления статуса цикламата как разрешенного к применению подсластителя [40]. В настоящее время цикламат разрешен к использованию в низкокалорийных пищевых продуктах в Канаде и в 40 других странах, однако в США по разным причинам ни цикламат, ни циклогексиламин не разрешены для использования в пищевых продуктах, несмотря на многочисленные подтверждения их безвредности.

В качестве низкокалорийных подсластителей выпускаются кальциевая и натриевая соли сахарина и его форма в виде свободной кислоты (3-оксо-2,3-дигидро-1,2-бензизотиазол-1,1-диоксид). По общепринятым данным сахарин в концентрациях вплоть до эквивалентных 10%-ному раствору сахарозы примерно в 300 раз слаще сахарозы, но сладость сахарина в зависимости от концентрации и пищевого матрикса варьирует и может превышать сладость сахарозы в 200–700 раз [47]. Сахарин у некоторых людей вызывает горькое, металлическое послевкусие, и с увеличением концентрации оно становится более заметным.



Цикламат натрия Циклогексиламин

Рис. 11.15. Образование циклогексиламина при гидролизе цикламата

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.: (495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

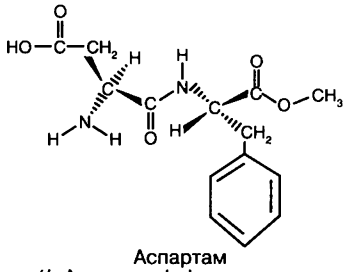
Безопасность сахарина исследовалась более 50 лет. Было выявлено, что у лабораторных животных он является причиной канцерогенеза с низкой инцидентностью, но многие ученые это оспаривают, приводя в качестве доводов, что в данных, полученных на животных, не учитываются особенности физиологии человека. У людей сахарин быстро всасывается и затем быстро выделяется с мочой. Несмотря на то что действующими нормативными актами США использование пищевых добавок, вызывающих онкологические заболевания у любых экспериментальных животных, запрещено, запрет на использование сахарина, предложенный *FDA* в 1977 г., был приостановлен Конгрессом в ожидании результатов дальнейшмх исследований. В 2000 г. сахарин в США был удален из списка канцерогенных для человека веществ, что опровергает необходимость маркировки содержащих его продуктов предупреждением о вреде для здоровья. В настоящее время сахарин разрешен к применению более чем в 90 странах.

Ацесульфам К [6-метил-1,2,3-оксатиазин-4(3Н)-он-2,2-диоксид] впервые был получен в Германии, а в США он был разрешен к применению в качестве низкокалорийного подсластителя в 1988 г. Сложность полного химического названия этого соединения привела к появлению официально зарегистрированного в качестве товарного знака его общепринятого названия (Ацесульфам К), поскольку при его синтезе используются ацетоуксусная и сульфаминовая кислоты, а по своей природе это калиевая соль.

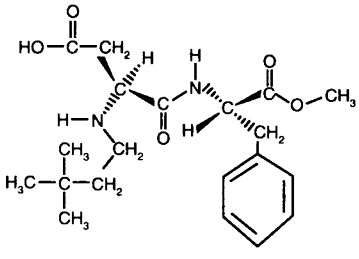
Ацесульфам К в растворе концентрацией 3% примерно в 200 раз слаще сахарозы, а качество его сладости лежит между цикламатами и сахарином. Поскольку в высоких концентрациях ацесульфам К дает металлический и горький привкусы, его целесообразно смешивать с другими низкокалорийными подсластителями (например, с аспартамом). Ацесульфам К очень стабилен при повышенных температурах хлебопекарного производства и стабилен в газированных безалкогольных напитках. Организмом человека ацесульфам К не усваивается, соответственно, не имеет калорийности и в неизмененном виде выводится с мочой. Широкомасштабные исследования не выявили каких-либо токсических эффектов этого подсластителя у животных.

11.8.2. Пептиды — аспартам, неотам и алитам

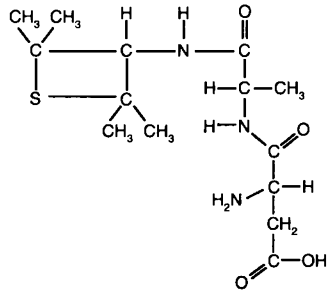
Пептидные подсластители появились в ответ на потребность в сладких ингредиентах пониженной калорийности. Хотя входящие в состав пептидов аминокислоты становятся энергетически доступными в процессе пищеварения, их интенсивная сладость позволяет выполнять функциональное назначение при очень низких концентрациях и очень малой калорийности. К группе пептидных подсластителей относятся аспартам, неотам, и алитам*, разрешенные во многих странах к применению в составе пищевых продуктов.



Аспартам
(*L*-Аспартил-*L*-фенилаланина метиловый эфир)



Неотам
(*L*-фенилаланина, N-{N-(3,3-диметилбутил)-*L*-α-аспартил}-, 1-метиловый эфир)



Алитам
[*L*-α-Аспартил-N-(2,2,4,4-тетраметил-3-тиэтанил)-*D*-аланинамид

Аспартам (*L*-аспартил-*L*-фенилаланина метиловый эфир) со сладостью в 180—200 раз выше, чем у сахарозы, был впервые разрешен к применению в США в 1981 г., и в настоящее время он разрешен к применению в более чем 75 странах. Для него характерен чистый сладкий вкус, хотя и отсутствуют некоторые преимущества сладости сахарозы. Двумя основными техническими недостатками аспартама являются

* В Европе и РФ алитам на применяется. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

его нестабильность в кислых условиях и быстрое разрушение при повышенных температурах. В кислых условиях, например в газированных безалкогольных напитках, потеря сладости наступает постепенно и зависит от температуры и значения pH. Пептидная природа аспартама делает его чувствительным к гидролизу (рис. 11.16), что обусловливает возможность других химических взаимодействий и его расщепления микроорганизмами. Помимо постепенной утраты сладости в результате либо гидролиза метилового эфира у фенилаланина, либо гидролиза пептидной связи между аминокислотами аспартам легко подвергается внутримолекулярной конденсации, особенно при повышенных температурах, с образованием дикетопиперазина (5-бензил-3,6-диоксо-2-пиперазин-уксусной кислоты, рис. 11.16). Для этой реакции особо благоприятны нейтральные и щелочные значения pH, так как в таких условиях непротонированные аминогруппы молекулы аспартама более доступны для реакции. Аналогично щелочные значения pH способствуют протеканию карбонил-аминных реакций, и в этих условиях аспартам легко реагирует с глюкозой и ванилином. При реакции с глюкозой основной проблемой является потеря аспартамом сладости при хранении, а во втором случае — утрата ванильного аромата.

Несмотря на то что аспартам состоит из природных аминокислот и предполагается, что его суточное потребление должно быть очень небольшим (0,8 г), выражалось определенное беспокойство по поводу его безопасности как пищевой добавки. Продукты, подслащиваемые аспартамом, должны быть четко маркированы по содержанию в них фенилаланина (их не следует употреблять больным фенилкетонурией, у которых отсутствует или присутствует в недостаточном количестве фермент 4-монооксигеназа, участвующая в метаболизме фенилаланина). Кроме того, высказывалось беспокойство по поводу возможных долгосрочных токсикологических эффектов метанола, высвобождаемого при гидролизе метилового эфира. Его медицинский аспект связан с возможностью метаболического превращения метанола в формальдегид, однако реально существующий метанол, высвобождаемый из пектиновых полимеров пищевых продуктов растительного происхождения (см. главу 3), не дает видимых токсических эффектов. Таким образом,

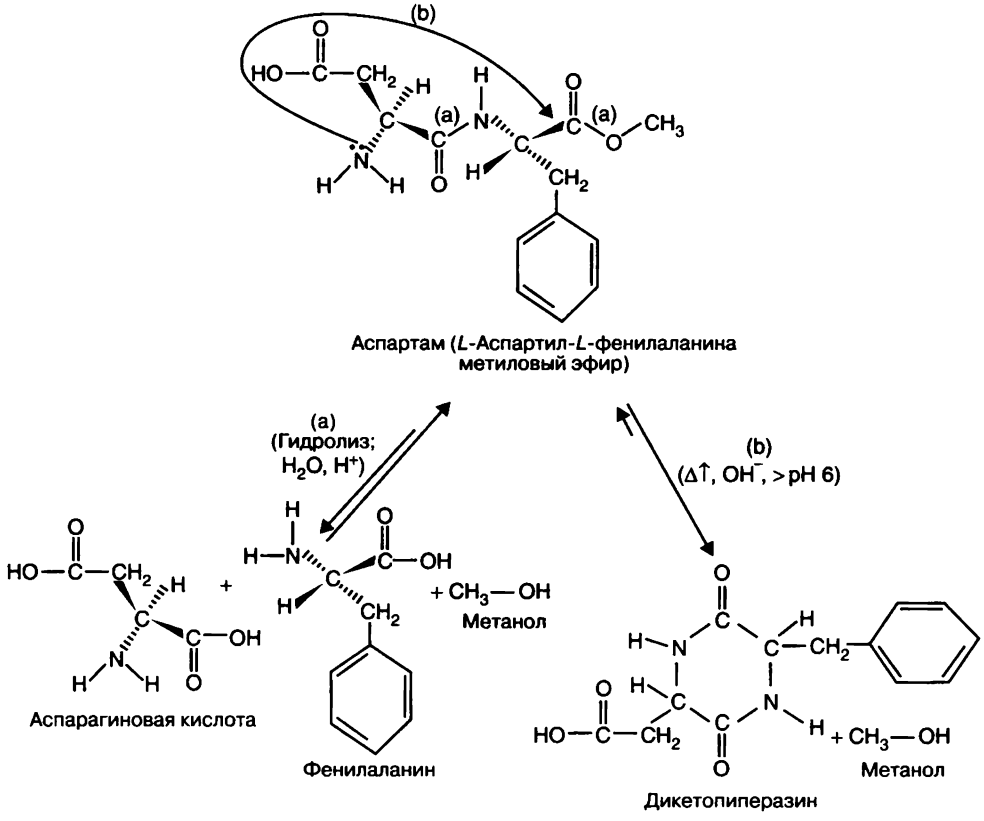


Рис. 11.16. Реакции расщепления аспартама

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

употребление аспартама здоровыми людьми не связано с неблагоприятными для их здоровья эффектами. Несмотря на имеющую место критику, широкомасштабные исследования показали, что образующийся из аспартама дикетопиперазин в тех концентрациях, которые теоретически могут быть в пищевых продуктах, не представляет для людей особого риска [29].

Неотам (*L*-фенилаланин, N-{N-(3,3-диметилбутил)-*L*-α-аспартил}-, 1-метиловый эфир) структурно сходен с аспартамом и разрешен к применению в США в составе пищевых продуктов в 2002 г. Неотам разработан в качестве добавки, так как он обладает повышенной стабильностью в условиях, характерных для кулинарной обработки, и имеет очень высокую сладость (в 7000–13 000 раз выше, чем у сахарозы). Это делает возможным его применение без предупреждающей маркировки для людей, больных фенилкетонурией. Интенсивная сладость неотама по сравнению со сладостью аспартама в значительной степени обусловлена присоединением 3,3-диметилбутилового заместителя к аминогруппе аспаринового фрагмента аспарагиновой кислоты. Это вносит в γ-группировку аспартама очень гидрофобный компонент, способствующий интенсивной сладости (см. главу 10). Поскольку использование очень низких концентраций неотама зачастую благоприятно влияет на вкус некоторых продуктов, он реализуется также и как усилитель вкуса (см. главу 10).

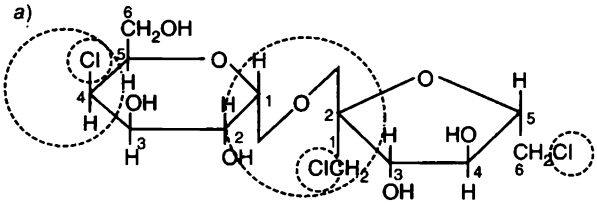
Алитам (*L*-α-аспартил-N-(2,2,4,4-тетраметил-3-тиэтанил)-*D*-аланинамид) — это подслащивающее вещество аминокислотного происхождения, обладающее сладостью примерно в 2000 раз большей, чем у сахарозы. Он дает чистый сладкий вкус. Широкомасштабные иследования показали, что алитам безопасен для употребления человеком, и в *FDA* в настоящее время рассматривается ходатайство на разрешение его использования в пищевых продуктах, поступившее еще в 1986 г. Несмотря на то что алитам в США все еще не разрешен к применению, в Австралии, Новой Зеландии, Китае и Мексике он уже разрешен.

11.8.3. Хлорсахариды. Сукралоза

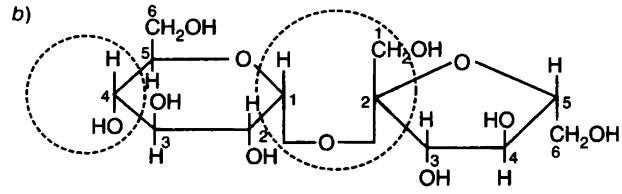
Хлорсахариды синтезируют путем сочетания селективного хлорирования молекул сахарида (сахара) и других стратегий синтеза, в том числе направленных конденсаций, и в результате образуются молекулы, обладающие интенсивной сладостью. Хлорсахарид сукралоза (1,6-дихлор-1,6-дидеокси-β-фруктофуранозил-4-хлор-α-*D*-галактопиранозид) была разрешена в США к использованию в пищевых продуктах в 1998–1999 гг., и в настоящее время она разрешена в более чем 40 странах.

Сукралоза примерно в 600 раз слаще сахарозы и обладает профилем сладости, подобным сахарозе, с отсутствием горечи и других видов нежелательного послевкусия. У нее высокие степень кристалличности и растворимость в воде, она очень стабильна при высоких температурах и достаточно стабильна при значениях pH, характерных для газированных безалкогольных напитков. При соблюдении правил транспортировки и хранения продуктов с сукралозой она гидролизуется до моносахаридов лишь в незначительной степени.

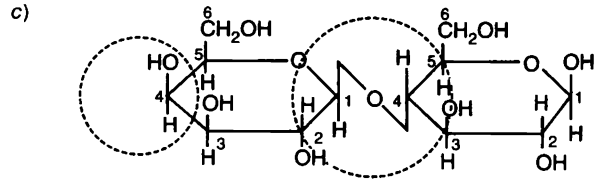
Молекула сукралозы способна противостоять атаке пищеварительных ферментов и метаболизму, так как у нее имеются особенности строения, плохо распознаваемые конститутивными гидролитическими ферментами. На рис. 11.17 эти особенности сравниваются со строением соответствующих природных сахаридов — сахарозы и лактозы (см. главу 3).



Сукралоза (4-хлор-4-деокси-α-*D*-галактопиранозил-(1→2)-1,6-дихлор-1,6-дидеокси-β-*D*-фруктофуранозид)



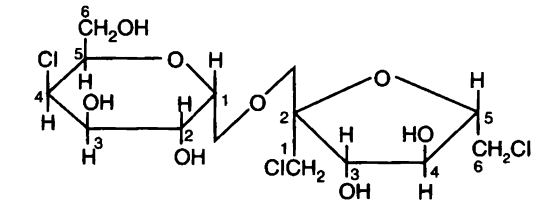
Сахароза (α-*D*-глюкопиранозил-(1→2)-α-*D*-фруктофуранозид)



Лактоза (β-*D*-галактопиранозил-(1→4)-β-*D*-глюкопиранозид)

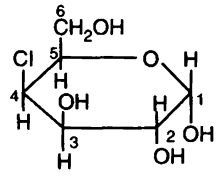
Рис. 11.17. Структурные особенности сукралозы (*a*), сахарозы (*b*) и лактозы (*c*)

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com



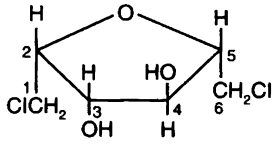
Сукралоза (4-хлор-4-деокси-α-*D*-галактопиранозил-(1→2)-1,6-дихлор-1,6-дидеокси-β-*D*-фруктофуранозид)

Гидролиз + H_2O



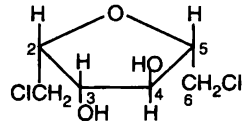
4-хлор-4-деокси-α-*D*-галактопираноза

+



1,6-дихлор-1,6-дидеокси-β-*D*-фруктофураноза

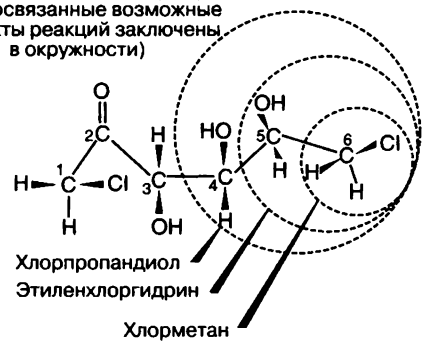
Рис. 11.18. Продукты гидролиза сукралозы



1,6-Дихлор-1,6-дидеокси-β-*D*-фруктофураноза

Δ↑ Условия, близкие к пиролизу (реакции дегидратации, фрагментации и конденсации)

Неустановленные продукты реакции (некоторые структурно взаимосвязанные возможные продукты реакций заключены в окружности)



Хлорпропандиол

Этиленхлоргидрин

Хлорметан

Рис. 11.19. Некоторые потенциально вредные вещества, образующиеся из 1,6-дихлор-1,6-дидеокси-β-*D*-фруктофуранозы

Помимо замещения в молекуле сукралозы трех гидроксильных групп атомами хлора, она также обладает гликозидной β-связью между молекулами галактозы и фруктозы (рис. 11.17, *a*). При сравнении особенностей строения сахарозы (рис. 11.17, *b*) и лактозы (рис. 11.17, *c*) можно обнаружить у сукралозы смешение двух базовых структур, что затрудняет ее распознавание обычными пищеварительными и метаболическими ферментами. Тем не менее небольшой гидролиз сукралозы в процессе пищеварения все-таки происходит путем либо кислотно-каталитического процесса, либо путем ее ферментации микроорганизмами (рис. 11.18).

Относительно безопасности сукралозы были проведены широкомасштабные исследования, которые в целом продемонстрировали ее безопасность для человека при ожидаемых уровнях потребления. Вместе с тем некоторые специалисты считают получение сукралозой разрешения на использование в пищевых продуктах преждевременным, поскольку в ней содержатся структурные компоненты вредных веществ, образующиеся, в частности, при термическом разрушении сукралозы (рис. 11.19).

11.8.4. Прочие интенсивные низкокалорийные подсластители

Напряженные усилия по поиску альтернативных подсластителей в последние двадцать лет привели к открытию большого количества новых сладких соединений. Некоторые из них в настоящее время исследуются относительно их безопасности для человека и промышленного потенциала. Эти соединения дополняют список менее известных, но разрабатываемых интенсивных подслащивающих веществ, и некоторые из них мы рассмотрим ниже.

Глицирризин (глицирризиновая кислота) является тритерпеновым сапонином, который встречается в корне солодки. Он в 50–100 раз слаще сахарозы и представляет собой гликозид, который после гидролиза дает два моля глюкуроновой кислоты и один моль глицирретиновой кислоты — тритерпена, родственного алеаноловой кислоте. Промышленно выпускаемый глицирризин аммония (полностью аммонизированная соль глицирризиновой кислоты) разрешен для использования в США только в качестве вкусовой

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

добавки и поверхностно-активного вещества, но не как подсластителя*. Глицирризиновая кислота используется преимущественно в производстве табачных изделий и некоторых пищевых продуктов и напитков, поскольку лакричный привкус ограничивает ее применение.

Смесь гликозидов, характерная для листьев южноамериканского растения *Stevia rebaudiana Bertoni*, является источником *стевиозида* и *ребаудиозидов*. Чистый стевиозид примерно в 300 раз слаще сахарозы. Стевиозид проявляет некоторую горечь и в высоких концентрациях дает нежелательное послевкусие, а ребаудиозид А дает лучший вкусовой профиль. Экстракты стевии промышленно выпускаются и широко применяются в Японии. Всесторонние токсикологические исследования их безопасности показали, что они безопасны для потребления человеком, но в США они еще не разрешены к применению.

Неогесперидин дигидрохалкон (НГДХ) — это бескалорийный подсластитель, который в 1500–2000 раз слаще сахарозы. Получают его из горьких флавононов плодов цитрусовых. Для НГДХ характерно замедленное проявление сладости и длительное сладкое послевкусие, снижающее ощущение сопутствующей горечи. Этот интенсивный подсластитель, как и другие аналогичные соединения, получают путем гидрогенизации: 1) нарингина с образованием нарингин дигидрохалкона; 2) неогесперидина с образованием неогесперидин дигидрохалкона; 3) гесперидина с образованием гесперидин дигидрохалкона 4'-О-глюкозида [44]. Безопасность НГДХ для человека всесторонне исследовалась и в целом была документально подтверждена. Хотя он разрешен к использованию в пищевых продуктах в Бельгии и Аргентине, в США в настоящее время проводятся дополнительные токсикологические исследования.

В настоящее время известно несколько сладких белков, и хорошо изучены *тауматин* I и II, получаемые из тропического африканского плода катемфе *(Thaumatococcus daniellii)*. Эти щелочные белки молекулярной массой около 20 000 кДа [58] примерно в 1600–2000 раз слаще сахарозы. Экстракт плода катемфе реализуется в Великобритании под торговой маркой «Талин», а его применение в качестве подсластителя и усилителя вкуса разрешено в Японии и Великобритании. В США он разрешен в качестве усилителя вкуса жевательной резинки. Для Талина характерна длительная сладость со слабым лакричным вкусом, что наряду с высокой ценой несколько ограничивает его применение.

Монеллин представляет собой сладкий белок, получаемый из ягод многолетней травянистой лианы *Dioscoreophyllum cumminsii*, произрастающей в Африке. Молекулярная масса монеллина составляет около 11 500 кДа, и он примерно в 3000 раз слаще сахарозы, причем сладость монеллина при кипячении снижается. Промышленное использование сладких белков ограничивается их высокой ценой, нестабильностью при нагревании и снижением сладости при хранении в растворе со значеним pH ниже 2 при комнатной температуре*.

Браззеин — это сладкий растительный белок (с 54 аминокислотными остатками), который первоначально был обнаружен в плодах африканской лианы *Pentadiplandra brazzeana*. Для производства этого сладкого белка были генетически модифицированы кормовые сорта кукурузы, и в настоящее время проводятся исследования возможностей промышленного производства этого подсластителя для пищевого применения путем его экстракции из зародышей кукурузных зерен. Он достаточно стабилен и обладает как сладостью, так и желаемым «ощущением во рту»*

Миракулин (другой щелочной белок) был выделен из плодов *Richadella dulcified* и не имеет собственного вкуса, но у него есть необычное свойство превращать кислый вкус в сладкий (например, он делает сладким вкус лимона). Миракулин — это гликопротеин молекулярной массой 42 000 кДа [58], и подобно другим белковым подсластителям он термолабилен и инактивируется при низких значениях pH. Сладкий вкус, который дает 0,1 М лимонной кислоты после дегустации 1 мМ раствора миракулина, эквивалентен вкусу 0,4 М раствора сахарозы, так что сладость раствора миракулина, на который воздействовал 0,1 М раствор лимонной кислоты, в 400 000 раз больше, чем у раствора сахарозы. Вкусовые эффекты миракулина ощущаются в течение 24 ч, что ограничивает его возможное использование. В 1970-е гг. в США миракулин был внесен на рассмотрение *FDA* как потенциальный подсластитель для больных диабетом, но его применение до сих пор не разрешено из-за недостатка данных по его безопасности для здоровья*

* В мировой практике в качестве подсластителя не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.9. Полиолы как подсластители, загустители и эмульгаторы

Простые полиолы или многоатомные спирты являются структурными аналогами углеводов, у которых в качестве функциональных групп имеются только гидроксильные группы (см. главу 3). Таким образом, простые сахара и многоатомные (сахарные) спирты структурно сходны, за исключением того, что у сахаров имеются также альдо- или кетогруппы (свободные или связанные), способные неблагоприятно влиять на их химическую стабильность (особенно при высоких температурах).

Большинство полиолов являются достаточно хорошо растворимыми в воде гигроскопичными веществами, высококонцентрированные водные растворы которых имеют среднюю вязкость, а полигидроксильные структуры полиолов обеспечивают их способность к гидратации, используемую в производстве пищевых продуктов. Специфические функции многоатомных спиртов — это регулирование вязкости и текстуры, придание изделиям объема, удержание влаги и снижение активности воды, регулирование степени кристаллизации, улучшение или сохранение мягкости изделий, повышение способности к регидратации обезвоженных пищевых продуктов и использование в качестве растворителя вкусоароматических веществ [24]. Многие области применения сахарных спиртов основаны на функциональных свойствах сахаров, белков, углеводов и смол.

Некоторые простые многоатомные спирты встречаются в природе, но из-за небольших их концентраций они зачастую не играют большой функциональной роли. Например, свободный глицерин присутствует в вине и пиве как продукт брожения, а сорбит встречается в таких фруктах, как персики, яблоки и сливы. Несмотря на то что количество простых многоатомных спиртов достаточно велико, относительно немногие из них используются в пищевой промышленности (рис. 11.20).

Большинство простых полиолов (сахарных спиртов) имеют сладкий вкус, но их сладость меньше, чем у сахарозы (табл. 11.4). Низкомолекулярные полиолы типа глицерина в высоких концентрациях дают легкий привкус горечи. При использовании простых полиолов в сухой форме они зачастую обладают приятным освежающим действием из-за отрицательной теплоты растворения. Применение некоторых многоатомных спиртов растет в значительной мере благодаря спросу на их подслащивающие свойства и пониженной калорийности. Исторически в США было принято, что в целях маркировки энергетическая ценность простых, полученных из сахаров полиолов составляет 16,7 кДж (4 ккал)/г, однако недавно эта точка зрения изменилась, поскольку в ЕС в 1990 г. полиолам как группе была присвоена энергетическая ценность в 10 кДж (2,4 ккал)/г. В настоящее время для различных промышленно выпускаемых полиолов *FDA* приписывает калорийность от 6,7 до 12,5 кДж (1,6–3,0 ккал)/г (табл. 11.4). Это заметно изменило позиционирование полиолов как пищевых ингредиентов, и можно ожидать, что их применение в производстве низкокалорийных продуктов с пониженным содержанием жира и продуктов «без сахара» в перспективе будет расти. Несмотря на то что вопрос о влиянии полиолов на больных диабетом остается во многом дискуссионным, в настоящее время считается, что их можно применять в рационе этой группы лиц.

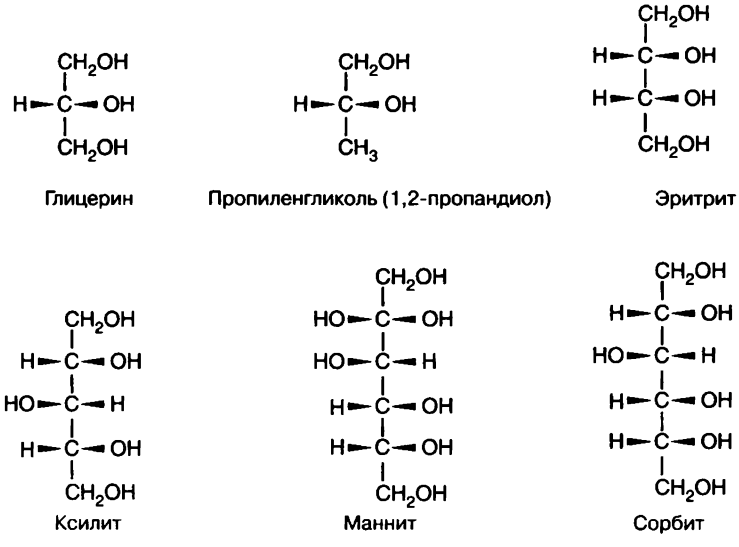


Рис. 11.20. Структуры простых многоатомных спиртов, используемых в качестве пищевых ингредиентов

Ксилит, сорбит, маннит, мальтит и лактит получают путем гидрогенизации соответственно ксилозы, глюкозы (рис. 11.21), маннозы, мальтозы и лактозы. Кроме того, в качестве пищевых ингредиентов (в частности, в производстве кондитерских изделий) используют гидролизаты гидрогенизированных углеводов, содержащие сорбит из глюкозы, мальтит из мальтозы и различные полимерные полиолы (гидрогенизированные мальтодекстрины) из оли-

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

Таблица 11.4

Относительная сладость и энергетическая ценность некоторых простых полиолов и сахаров

Подслащивающее вещество	Относительная сладость [a] (сахароза = 1)	Энергетическая ценность [b], кДж/г
Простые полиолы		
Эритрит	0,7	0,84
Маннит	0,6	6,69
Лактит	0,3	8,36
Изомальт	0,4–0,6	8,36
Ксилит	1,0	10,03
Сорбит	0,5	10,87
Мальтит	0,8	12,54
Гидрогенизированный кукурузный сироп	0,3–0,75	12,54
Сахара		
Ксилоза	0,7	16,72
Глюкоза	0,5–0,8	16,72
Фруктоза	1,2–1,5	16,72
Галактоза	0,6	16,72
Манноза	0,4	16,72
Лактоза	0,2	16,72
Мальтоза	0,5	16,72
Сахароза	1,0	16,72

[a] Приведены опубликованные значения относительной сладости, однако концентрации подслащивающего вещества и матрикс пищевого продукта или напитка могут существенно влиять на фактическую относительную сладость.

[b] Показатели энергетической ценности, принятые *FDA* США, 1 ккал = 4,1816 кДж.

госахаридов. Изомальт получают из сахарозы с использованием многостадийного процесса (рис. 11.22) — сначала происходит ферментативная изомеризация гликозидной связи сахарозы, соединяющей 1-ю и 2-ю позиции, в 1,6-связи соответственно между молекулами глюкозы и фруктозы. Последующая гидрогенизация этого промежуточного соединения приводит к получению эквимолярной смеси двух дисахаридных полиолов — глюкозоманнитола и глюкозосорбитола.

Кроме того, простые полиолы могут служить сырьем для производства других пищевых ингредиентов, в частности эмульгаторов (см. главу 13). Примером является использование сорбита в производстве спэнов и твинов (рис. 11.23), где сорбит сначала превращается в сорбитан, а затем подвергается этерификации жирной кислотой (в данном случае со стеариновой), что придает образующейся молекуле сорбитмоностеарата (спэна) амфифильные свойства. Оставшиеся у сорбитмоностеарата гидроксильные группы могут затем предоставлять реакционные сайты для присоединения соединенных эфирной связью повторяющихся молекул этиленоксида, давая в результате полисорбатный эмульгатор (твин).

Для пищевого применения были разработаны также полимерные формы многоатомных спиртов с большой молекулярной массой. Если этиленгликоль ($CH_2OH–CH_2OH$) токсичен, то полиэтиленгликоль 6000 разрешен к применению в составе некоторых пищевых покрытий и в целях пластифицирования. Полезными свойствами обладает также полиглицерин $[CH_2OH–CHOH–CH_2–(O–CH_2CHOH–CH_2)_n–O–CH_2–CHOH–CH_2OH]$, образующийся из глицерина

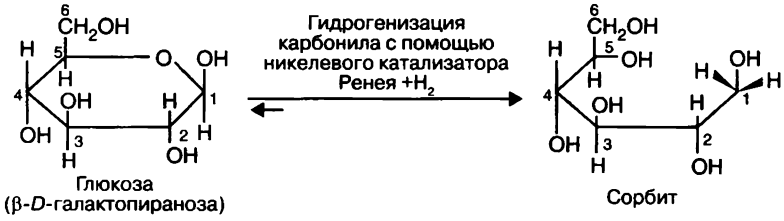


Рис. 11.21. Реакция гидрогенизации глюкозы при получении сорбита

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

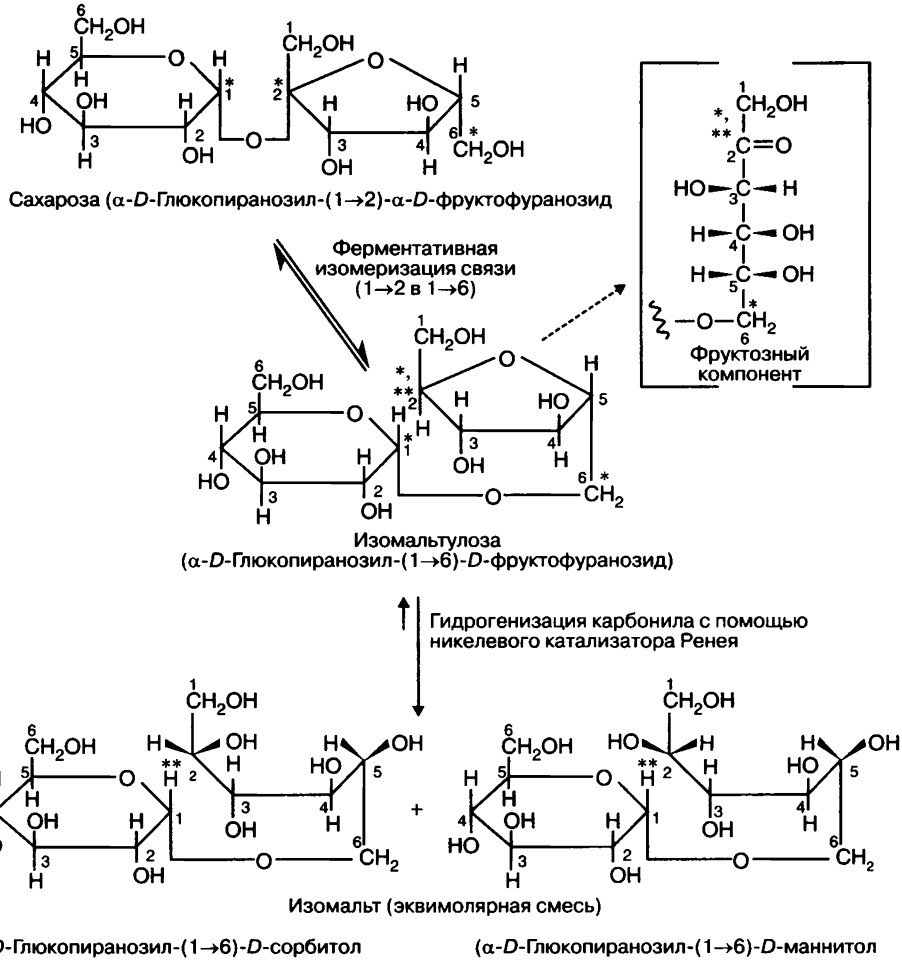


Рис. 11.22. Реакции, протекающие при получении изомальта

путем катализируемой щелочной полимеризации. Его можно модифицировать путем этерификации жирными кислотами, получив в результате вещества с липидоподобными свойствами. Эти полиглицериновые вещества разрешены к применению, так как продукты их гидролиза (глицерин и жирные кислоты) при нормальных условиях метаболизируются.

Умеренно дегидратированные пищевые продукты заслуживают особого рассмотрения, поскольку многоатомные спирты способствуют повышению их стабильности. Несмотря на то что такие пищевые продукты содержат достаточно высокое количество влаги (15–30%), при комнатных температурах они устойчивы к микробиологической порче. Некоторые привычные продукты, в том числе сухофрукты, джемы, желе, маршмеллоу, фруктовые кексы и вяленое мясо, обязаны своей стабильностью именно дегидратации [35]. Некоторые подобные изделия перед употреблением регидратируют, но для всех них характерна пластичная текстура и их можно употреблять в пищу без дополнительной обработки. Разрабатываются также консервированные мясные, овощные, фруктовые и комбинированные готовые блюда с полиолами.

У большинства умеренно дегидратированных пищевых продуктов значение активности воды составляет 0,70–0,85, а в продуктах с увлажнителями содержание влаги составляет около 20 г/100 г СВ (массовая доля H_2O —82%). Если такие пищевые продукты с активностью воды около 0,85 получают путем десорбции, они остаются подверженными действию плесеней и дрожжей, и для решения этой проблемы ингредиенты при приготовлении нагревают и добавляют противогрибковые средства, например сорбиновую кислоту.

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

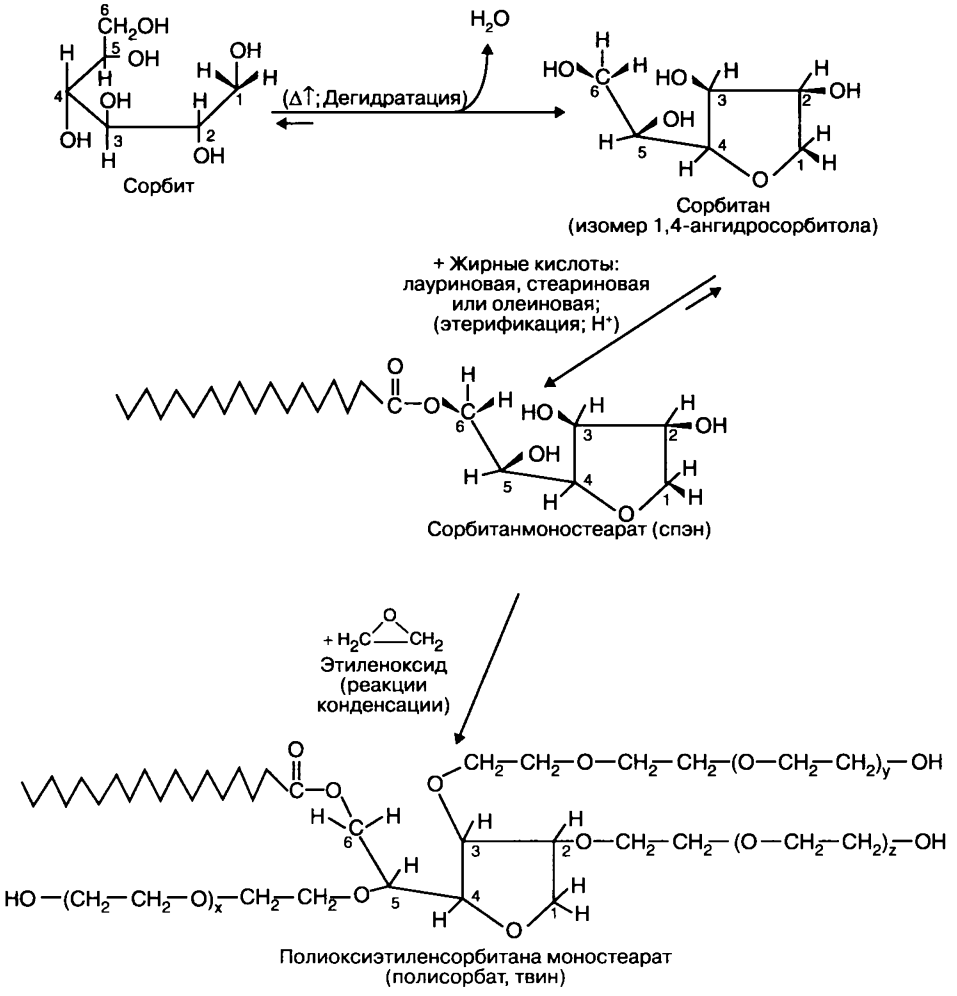


Рис. 11.23. Реакции, использующиеся в производстве спэнов и твинов (полисорбатов) из сорбита

Для достижения требуемого значения активности воды обычно добавляют влагоудерживающее вещество, связывающее воду и обеспечивающее мягкость текстуры продукта. Для производства таких пищевых продуктов используют относительно небольшое число веществ — главным образом глицерин, сахарозу, глюкозу, пропиленгликоль и хлорид натрия, которые достаточно эффективны для снижения значения a_w и одновременно органолептически приемлемы. Кроме того, на основных принципах дегидратации с помощью полиолов основаны рецептуры современных кондитерских изделий «без сахара».

11.10. Стабилизаторы и загустители

Многие гидроколлоиды благодаря своим уникальным текстурным, структурным, функциональным и загущающим свойствам широко используются в пищевых продуктах, обеспечивая стабилизацию эмульсий, суспензий и пен. Большинство этих веществ, которые иногда относят к смолам или камедям, получают из натурального сырья, хотя некоторые из них для обеспечения требуемых свойств подвергают химической модификации. Многие стабилизаторы и загустители являются полисахаридами, в частности, гуммиарабик, гуаровая камедь, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), каррагинан, агар, крахмал и пектин. Химические свойства этих веществ и родственных углеводов рассматриваются в главе 3. Одним из немногих широко используемых стабилизаторов неуглеводной природы является желатин (белок, получаемый из коллаге-

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.: (495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

на)*, подробнее о котором см. главу 5. Все эффективные стабилизаторы и загустители гидрофильны и диспергируются в растворе в виде коллоидов, откуда и их название — гидроколлоиды. К общим свойствам таких эффективных гидроколлоидов относятся хорошая растворимость в воде, способность повышать вязкость и (в некоторых случаях) способность к гелеобразованию (см. главу 3). К специфическим функциям гидроколлоидов относятся улучшение текстуры, подавление кристаллизации (сахара и льда), стабилизация эмульсий и пен, уменьшение липкости сахарной глазури на хлебобулочных и кондитерских изделиях, а также возможность инкапсулировать ароматизаторы [31]. Гидроколлоиды обычно используют в концентрациях около 2% и ниже, поскольку многие из них характеризуются ограниченной диспергируемостью, а при этих концентрациях обеспечиваются требуемые функциональные свойства. Эффективность гидроколлоидов во многом непосредственно зависит от их способности повышать вязкость — например, благодаря этому гидроколлоиды стабилизируют эмульсии типа «масло-в-воде». Действовать как истинные эмульгаторы они не могут, так как отдельные молекулы не обладают необходимым сочетанием сильных гидрофильных и липофильных свойств.

11.11. Заменители жира

Несмотря на то что жир является важным компонентом пищевых продуктов, слишком большое его содержание в рационе ассоциируют с повышенным риском ишемической болезни сердца и некоторыми онкологическими заболеваниями. Потребителям рекомендуют употреблять нежирные виды мяса, в частности рыбу и мясо птицы без кожи, маложирные молочные продукты и ограничить потребление жареной пищи, хлебобулочных изделий с высоким содержанием жира, а также соусов и приправ. При этом потребители желают потреблять продукты с существенно более низкой калорийностью, но обладающие органолептическими свойствами, близкими к традиционным продуктам с высоким содержанием жира.

Вместе с тем свой вклад в избыточное потребление жира населением развитых стран внесла растущая доступность полуфабрикатов, но они позводили также разрабатывать технологии производства и маркетинга пищевых продуктов с пониженным содержанием жира, имитирующих полножировые их аналоги. В течение последних двадцати лет в модификации и разработке ингредиентов продуктов с пониженным содержанием жира был достигнут большой прогресс. Для производства разнообразных пищевых продуктов с пониженным содержанием жира появилось много ингредиентов, относящихся к нескольким химическим группам, в том числе углеводы, белки, липиды и чисто синтетические соединения.

При частичном или полном удалении жира из пищевых продуктов их свойства изменяются, и жир необходимо заменить каким-либо другим компонентом. Так появилось понятие «заменитель жира», которым обозначают используемые для этого ингредиенты. Если некоторое вещество обеспечивает физические и органолептические свойства, идентичные жирам, но с меньшим вкладом в калорийность, его называются «жиром-эквивалентом». Такие ингредиенты придают пищевым продуктам жироподобные свойства и физически участвуют в технологических процессах (например, в жарке).

Ингредиенты, которые функционально не полностью эквивалентны жирам, называют «имитаторами жира». Их получают специально для имитации эффекта жира в конкретных областях применения, например, для имитации «псевдовлажности» определенных типов хлебобулочных изделий с высоким содержанием жира. Чтобы обеспечить имитацию желаемых жировых свойств, можно использовать, например, модифицированные крахмалы, способствующие формированию органолептических свойств, обусловленных увеличением объема и повышением влагоудерживающей способности**.

11.11.1. Углеводные имитаторы жира

Для частичного обеспечения функций жира в продуктах с пониженным его содержанием используют модифицированные крахмалы, камеди, гемицеллюлозы и целлюлозу в разных формах (подробнее о них см.

* В мировой практике желатин к пищевым добавкам не относят. — *Примеч. науч. ред.*

** У пищевых добавок не выделяется функция «заменитель или имитатор жира». Многие из представленных в этом разделе веществ используются как другие категории пищевых добавок — стабилизаторы, эмульгаторы, загустители и наполнители. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

главу 3 и разделы 11.9–11.10 данной главы). Дополнительная информация по их применению в продуктах с пониженным содержанием жира приводится также в работах [2, 37]. Некоторые углеводные имитаторы жира практически не калорийны (например, камеди и целлюлоза), тогда как другие (например, модифицированные крахмалы) имеют энергетическую ценность до 16,7 кДж (4 ккал)/г вместо 37,6 кДж (9 ккал)/г у традиционных жиров. Эти вещества имитируют гладкую консистенцию и жировую кремообразность пищевых продуктов преимущественно благодаря своей ВУС и объемности твердой фазы, что способствует формированию жироподобных ощущений, например, мягкости и текстуры хлебобулочных изделий и мороженого.

11.11.2. Белковые имитаторы жира

Использование некоторых белков (см. главу 5) в качестве имитаторов жира [39] позволило присвоить им статус *GRAS, о*днако функциональные свойства этих белков весьма ограничены, так как при повышенных температурах (требуемых, например, для жарки) они не ведут себя как жиры. Тем не менее, некоторые из этих белковых ингредиентов (энергетическая ценность — 16,7 кДж или 4 ккал/г) могут применяться для замены жиров в пищевых продуктах, в частности, в эмульсиях типа «масло-в-воде». Для этого их можно приготовить в виде микрогранул диаметром менее 3 мкм — в этом случае они имитируют физическую природу жиров, напоминая действие эластичных шарикоподшипников. Кроме того, в растворе такие белки создают эффект загущения, ощущение маслянистости и обволакивания ротовой полости. В твердых продуктах с пониженным содержанием жира достаточно функционален желатин* (в маргарине, например, он обеспечивает термически обратимое загущение и впоследствии придает маргарину требуемую твердость).

В производстве белковых имитаторов жира используют несколько стратегий с использованием 1) гидрофобных взаимодействий; 2) изоэлектрического осаждения; 3) тепловой денатурации и/или коагуляции; 4) образования комплексов «белок–белок» или 5) комплексов «белок–полисахарид» [39]. Эти процессы зачастую сопровождаются применением усилий сдвига, что обеспечивает образование белковых микрочастиц.

11.11.3. Синтетические триацилглицерины пониженной калорийности

Некоторые триацилглицерины** (см. главу 4) обладают тем преимуществом, что благодаря своим уникальным структурным особенностям при употреблении их в пищу людьми (и животными с однокамерным желудком) они не отдают все свои калории. Такие триацилглицерины синтезируют различными способами путем гидрогенизации и направленных реакций этерификации или переэтерификации. К этой группе липидов относятся триацилглицерины (ТАГи) со средней длиной цепи, которые уже давно используются для лечения определенных расстройств липидного обмена. Такие ТАГи состоят из насыщенных жирных кислот с длиной цепи от C_6 до C_{12}, обладающих энергетической ценностью около 34,7 кДж (8,3 ккал)/г, тогда как у «нормальных» ТАГ она составляет 37,6 кДж (9 ккал)/г [34].

Другой стратегией является включение в молекулу ТАГ насыщенных низкомолекулярных жирных кислот (C_2–C_5) вместе с высокомолекулярными (C_{14}–C_{24}), что дает существенное снижение энергетической ценности. Такое частичное снижение калорийности обусловлено тем, что низкомолекулярные жирные кислоты дают меньше калорий на единицу массы, чем высокомолекулярные. Кроме того, позиция высокомолекулярной жирной кислоты в молекуле глицерина существенно влияет на ее всасывание. В некоторых позиционных сочетаниях низко- и высокомолекулярных насыщенных жирных кислот всасывание последних может быть снижено более чем наполовину (см. главу 4).

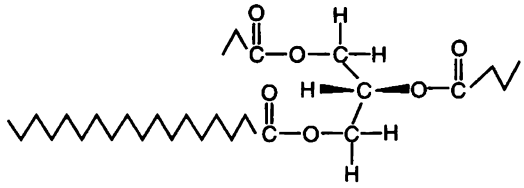
На этих принципах было разработано сочетание триацилглицеринов, известное под торговой маркой «Салатрим» (*Salatrim*), название которого является сокращением от *Short and long acyltriglyceride molecule* [52]. Салатрим представляет собой смесь триацилглицеринов, состоящих в основном из получаемой из гидрогенизированных растительных жиров стеариновой кислоты (C_{18}) как высокомолекулярной, а также различных соотношений уксусной, пропионовой и масляной кислот (соответственно, C_2, C_3, и C_4) как

* В мировой практике желатин не относят к пищевым добавкам. — *Примеч. науч. ред.*

** В мировой практике, т. е. в соответствии с международным, европейским и российским законодательством, триацилглицерины в качестве пищевых добавок не применяются. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

низкомолекулярных. С различными пищевыми продуктами на основе Салатрима человек получает от 19,6 до 21,3 кДж (4,7–5,1 ккал/г, причем для обеспечения требуемых физических свойств (например, температуры плавления) состав жирных кислот можно регулировать.



Изомер Салатрима
(1-пропионил-2-бутирил-3-стеароил-*sn*-глицерина)

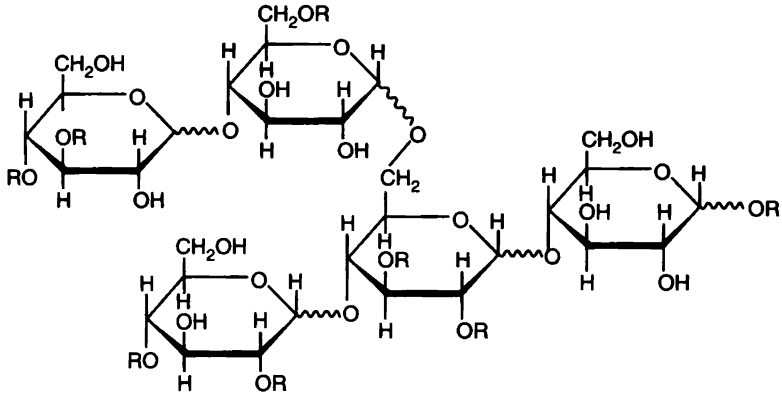
Капренин (*Caprenin*) — это торговая марка синтезированного аналогичным образом триацилглицеринового продукта с пониженной калорийностью (около 20,9 кДж или 5 ккал/г). В нем содержатся жирные кислоты со средней длиной цепи — каприловая (C_6) и каприновая (C_{10}), а также высокомолекулярная бегеновая кислота (C_{22}). Капренин нашел применение в производстве кондитерских плиток. Каприловую и каприновую кислоты получают из кокосового и пальмового масел, а бегеновую кислоту — из гидрогенизированных рапсового и арахисового масел, а также рыбьего жира и жира морепродуктов. В арахисовом масле содержится около 3% бегеновой кислоты, тогда как в рапсовом — около 35% эруковой кислоты ($C_{22:1}$), которая гидрогенизируется до бегеновой. В рыбьем жире и жирах из морепродуктов зачастую содержится более 10% докозагексаеновой кислоты (ДГК, *DHA*), которая также гидрогенизируется до бегеновой.

11.11.4. Синтетические заменители жира

Известно, что свойствами имитаторов либо заменителей жира обладают многие синтетические соединения [1, 2]. Многие из них содержат ТАГ-подобные структурные и функциональные группы, например триалкоксикарбаллаты, которые по сравнению с обычными жирами имеют обращенные эфирные группы (то есть вместо этерификации глицерина жирными кислотами трикарбоновая кислота этерифицируется насыщенными спиртами — алканолами по классификации *IUPAC*). Благодаря своей синтетической природе эти соединения устойчивы к ферментативному гидролизу и почти не всасываются в кишечнике. Разрешение *FDA* на применение в составе пищевых продуктов многих таких веществ получить довольно трудно, так что не ясно, будут ли какие-либо подобные соединения использоваться в пищевой промышленности.

11.11.4.1. Полидекстроза

Несмотря на то что полидекстроза преимущественно используется в качестве низкокалорийного углеводного наполнителя, иногда она применяется и как имитатор жира. Поскольку энергетическая ценность полидекстрозы составляет лишь 4,18 кДж (1 ккал)/г, она особенно привлекательна как ингредиент разнонаправленного действия, снижающий количество калорий, поступающих как от углеводов, так и от жиров. Промышленно выпускаемую полидекстрозу (торговая марка *Litesse*) получают путем полимеризации глюкозы (не менее 90%), сорбита (не более 2%) и лимонной кислоты; при этом в ней содержится незначительные количества мономера глюкозы и 1,6-ангидроглюкозы [2]. Для сохранения требуемой растворимости в воде молекулярная масса полидекстрозных полимеров должна составлять менее 22 000 кДа.

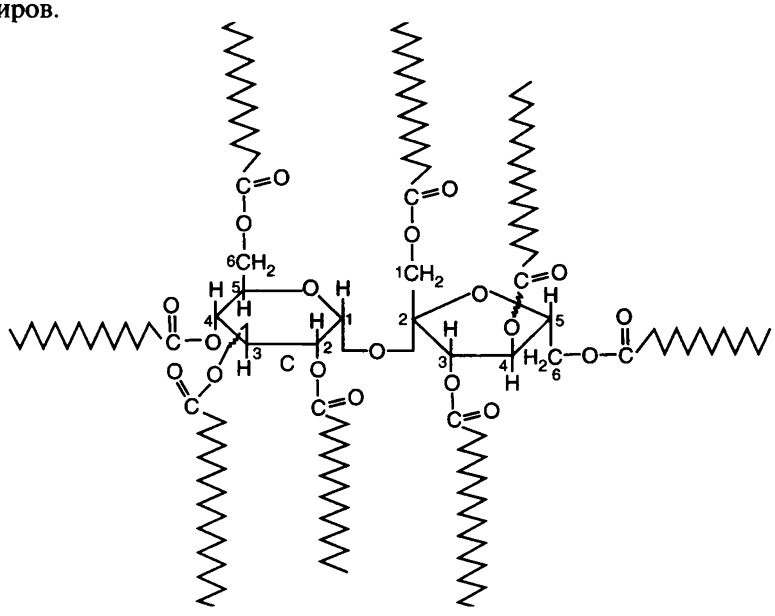


Структура полидекстрозы

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

11.11.4.2. Полиэфиры сахарозы

Полиэфиры сахарозы составляют семейство веществ [1], образующихся в результате этерификации двух или более из восьми гидроксильных групп молекулы сахарозы. Некоторые полиэфиры сахарозы встречаются в природе (например, в воскоподобном покрытии листьев некоторых растений). Промышленно полиэфиры сахарозы получают путем этерификации сахарозы из натурального сырья, жирными кислотами, причем результирующие полярные свойства и температура плавления зависят как от выбора жирных кислот, так и от степени этерификации. Полиэфиры сахарозы с более низкой степенью этерификации обладают амфифильными свойствами, позволяющими использовать эти ингредиенты как эмульгаторы. Полная этерификация молекул сахарозы, особенно высокомолекулярными жирными кислотами, дает липофильные, неусвояемые и невсасываемые октаэфиры сахарозы, обладающие физико-химическими свойствами обычных жиров.



Изомер полиэфира сахарозы

Несмотря на то что эмульгаторы из полиэфиров сахарозы широко не применяются, они в 1983 г. были разрешены к применению в пищевых продуктах в США, при этом дискуссии относительно их безопасности для здоровья практически не было. Это стало следствием того, что в качестве эмульгаторов используются лишь небольшие количества полиэфиров сахарозы, которые благодаря своей низкой степени этерификации легко усваиваются. С другой стороны, полиэфиры сахарозы как заменители жира (октаэфиры, торговые марки — *Olestra* и *Olean*), получили статус *GRAS* и были разрешены к ограниченному применению как жарочные жиры для снеков (в частности, картофельных и кукурузных чипсов) только в 1996 г. после двадцати лет исследований их безопасности для здоровья. Основным предметом дискуссии, ставшим причиной лишь ограниченного разрешения на использование заменителей жира из полиэфиров сахарозы, стали опасения по поводу ингибирования ими всасывания жирорастворимых витаминов и микронутриентов, а также возможных диареи и других расстройств пищеварения из-за прохождения больших количеств жироподобных полиэфиров сахарозы через желудочно-кишечный тракт.

11.12. Вещества, улучшающие жевательные свойства

Такие вещества* применяют для обеспечения длительности пластичных свойств жевательной резинки. Они могут быть как натуральными, так синтетическими, причем оба вида довольно стойки. Синтетиче-

*В мировой практике вещества, улучшающие жевательные свойства, к пищевым добавкам не относят. — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

ские вещества получают по методу Фишера–Тропша с участием монооксида углерода, водорода и катализатора, а после дополнительной обработки с удалением низкомолекулярных соединений продукт гидрогенизируют с образованием синтетического парафина [10]. Химически модифицированные вещества, улучшающие жевательные свойства, получают частичной гидрогенизацией канифоли, в значительной степени состоящей из дитерпенов, и дальнейшей этерификацией образующихся продуктов с использованием пентаэритрита или глицерина. Были получены и другие полимеры из этиленовых, бутадиеновых или виниловых мономеров, подобные синтетическому каучуку.

Значительную часть основ жевательных резинок получают непосредственно из растительных камедей, которые очищают экстенсивными методами нагревания, центрифугирования и фильтрования. К широко используемым веществам натурального происхождения относятся чикл из растений семейства *Sapotaceae* (*Sapodilla*), камеди из *Gutta Katiau* (растений рода *Palaquium*) и сухие вещества латекса (натурального каучука) из *Henea brasiliensis*.

11.13. Вещества, повышающие твердость изделий

При тепловой обработке или замораживании растительных тканей они обычно размягчаются из-за изменений в клеточной структуре. Стабильность и целостность этих тканей зависит от количества неповрежденных клеток и сохранения сшивок между компонентами клеточных стенок. Большую роль в стабилизации структуры путем образования перекрестных межмолекулярных сшивок карбоксильных групп через поливалентные катионы играют пектиновые вещества (см. главы 3 и 17). Несмотря на то что значительные количества поливалентных катионов присутствуют нативно, зачастую вносят соли кальция (0,1–0,25% по кальцию). Это увеличивает твердость продукта, поскольку усиленное образование поперечных сшивок приводит к увеличению содержания относительно нерастворимых пектинатов и пектатов кальция. Эти стабилизированные структуры поддерживают тканевую массу, и целостность сохраняется даже при тепловой обработке. Многие плоды, в том числе томаты, ягоды и ломтики яблок, обычно отверждают путем внесения перед консервированием или замораживанием одной или нескольких солей кальция. К наиболее часто используемым солям относятся хлорид, цитрат, сульфат, лактат и однозамещенный фосфат кальция. Большинство этих кальциевых солей умеренно растворимы, а некоторые из них в высоких концентрациях способствуют образованию горького привкуса.

К ферментированным соленым и маринованным огурцам добавляют кислые соли квасцов — алюмосульфат натрия [$NaAl(SO_4)_2$ $12H_2O$], алюмосульфат калия, алюмосульфат аммония, а также сульфат алюминия [$Al_2(SO_4)_3$ $18H_2O$], что делает огурцы более хрустящими. Считается, что ион трехвалентного алюминия способствует созданию хрустящей консистенции путем образования комплексов с пектиновыми веществами, однако в некоторых исследованиях было показано, что сульфат алюминия оказывает размягчающий эффект на расфасованные и пастеризованные соленые и маринованные изделия, и вносить его не следует [14]. Причины такого размягчения еще не ясны, но присутствие сульфата алюминия мешает проявлению отверждающих эффектов, обычно обусловливаемых корректировкой значения pH примерно до 3,8 с помощью уксусной или молочной кислот.

На твердость и текстуру некоторых овощей и фруктов в процессе технологической обработки можно повлиять без непосредственного внесения добавок. Например, при низкотемпературном бланшировании (70–82 °C в течение 3–15 мин) фермент пектинметилэстераза активируется, а не инактивируется как при обычном бланшировании при температуре 88–100 °C в течение 3 мин. Степень твердости после низкотемпературной обработки можно регулировать подобором соответствующего времени выдерживания перед стерилизацией в автоклаве [57]. Пектинметилэстераза гидролизует этерифицированный метанол из карбоксильных групп пектина с образованием пектиновой и пектовой кислот. Пектин с относительно небольшим количеством свободных карбоксильных групп не является сильносвязанным, и поэтому он водорастворим, а значит, может мигрировать из клеточной стенки. С другой стороны, пектиновая и пектовая кислоты имеют много свободных гидроксильных групп, и поэтому они относительно нерастворимы, особенно в присутствии эндо- или экзогенных ионов кальция. В результате эти соединения остаются в клеточных стенках при переработке и формируют прочную текстуру. Эффекты отверждения вследствие активации пектинметилэстеразы характерны для молодой лущильной фасоли, картофеля, цветной капу-

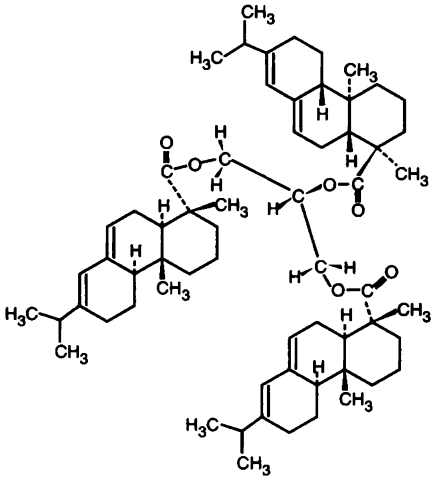
BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com

сты и кислых видов вишни, а также для некоторых овощей и фруктов. Добавление ионов кальция в сочетании с активацией этого фермента дает аддитивный отверждающий эффект.

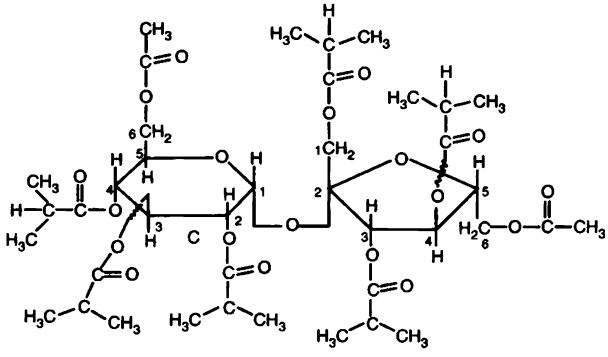
11.14. Внешний вид изделий и осветлители

Внешний вид напитков очень важен для признания их потребителями, причем важнейшим фактором является стабильность дисперсии коллоидных частиц или других структур. В некоторых случаях внешний вид можно адекватно поддерживать путем замедления образования осадка с помощью ассоциирования ионов и увеличения вязкости, например, при добавлении к молоку каррагинана (см. главу 3) в производстве шоколадного молока, ароматизированного какао-порошком. Вместе с тем простое увеличение вязкости для некоторых продуктов нецелесообразно или его недостаточно для стабилизации внешнего вида жидких пищевых продуктов или напитков. В таких случаях удобнее стабилизировать внешний вид путем изменения плотности дисперсной фазы*.

Сохранение мути в безалкогольных напитках путем диспергирования ароматизирующих жиров, особенно тех, в составе которых входят цитрусовые масла (терпены, см. главу 10), достигается увеличением плотности жировой фазы (плотность 0,85–0,90 г/см^3), чтобы приблизить ее к поддерживающей объемной фазе растворенного в воде сахара (плотность 1,04–1,05 г/см^3). В прошлом это достигалось растворением в ароматизирующем цитрусовом масле небольшого количества бромированного растительного масла (плотность 1,23–1,33 г/см^3). Бромированные растительные масла получают при реакции ненасыщенных растительных масел с бромом (рис. 11.24), однако из-за токсикологических последствий при использовании цитрусовых масел бромированные растительные масла часто заменяют альтернативными «утяжеляющими» веществами. К последним относятся даммаровые камеди (удельная масса около 1,05 г/см^3), которые являются природными экссудатами кустарников семейств *Caesalpinaceae* и *Dipterocarpacea*, и эфиры канифоли, в частности, глицерилтриабиетат (удельная масса около 1,05 г/см^3), получаемый из экстракционной древесной канифоли. Кроме того, широко используется диацетатгексаизобутират сахарозы (плотность 1,10–1,14 г/см^3), то есть синтетический полиэфир сахарозы. Показано, что, если внести «утяжеляющие» соединения в состав соевого масла и диспергировать их в стандартизованной эмульсии типа «масло-в-воде», массовые концентрации в соевом масле, соответствующие их изоплотности с водой, составляют для бромированного растительного масла, диацетатгексаизобутирата сахарозы, даммаровой смолы и эфира канифоли соответственно 25, 45, 55 и 55 [7].



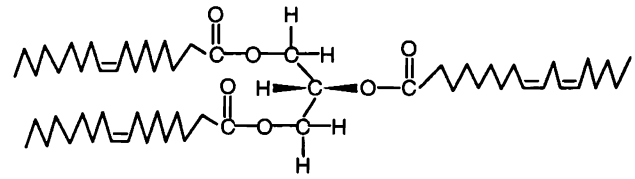
Глицерилтриабиетат



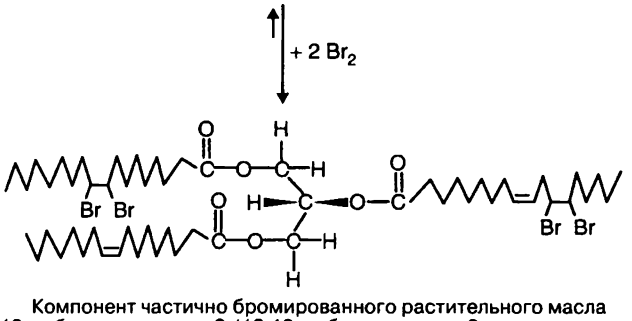
Диацетатгексаизобутират сахарозы

* В мировой практике осветлители к пищевым добавкам не относят, они являются технологическими вспомогательными средствами, то есть «технологическими добавками». — *Примеч. науч. ред.*

BANG & BONSOMER
Функциональность. Качество. Мировой опыт.
ведущий поставщик добавок и ингредиентов для пищевой промышленности
Тел.:(495) 258-40-40. E-mail: reception@bangbonsomer.com



Компонент растительного масла
[1-олеолил-2-линолеолил-3-олеоил-*sn*-глицерин]



Компонент частично бромированного растительного масла
[1-(9,10-дибромстереолил-2-(12,13-дибромолеолил-3-олеоил-*sn*-глицерин]

Рис. 11.24. Реакции, используемые для получения бромированных растительных масел

В пиве, вине и многих фруктовых соках образование мути, осадка и ухудшение качества в результате окисления всегда было проблемой. Все эти процессы связаны с присутствием натуральных фенольных соединений (их химический состав и свойства, в том числе антоцианинов, флавоноидов, проантоцианидинов и таннинов рассматриваются в главе 9). Наряду с полифенолами в формировании коллоидной мути участвуют белки и пектиновые вещества. Для частичного гидролиза высокомолекулярных белков (см. главу 6) и снижения тем самым образования мути используют специфические ферменты, однако иногда избыточная их активность может неблагоприятно повлиять на другие желаемые свойства, например, на пенообразование пива.

Одним из способов регулирования состава полифенолов в целях контроля желаемых и нежелательных эффектов является применение различных осветляющих («оклеивающих») веществ и адсорбентов. Уже образовавшуюся муть можно хотя бы частично удалить с помощью диатомитовых фильтров. Многие из применяемых осветляющих средств являются неселективными, и их влияние на содержание полифенолов в целом плохо предсказуемо. Адсорбция обычно максимальна в тех случаях, когда растворимость адсорбируемого вещества минимальна, а суспендированные или почти нерастворимые материалы типа таннино-белковых комплексов имеют тенденцию накапливаться на границе раздела фаз. По мере возрастания активности адсорбента сохраняется тенденция к адсорбции веществ с меньшей растворимостью, но адсорбируются и более растворимые соединения.

Типичным представителем среднеэффективных минеральных веществ, нашедших применение в качестве осветляющих средств, является бентонит — монтмориллонитовая глина. Монтмориллонит — это сложный гидратный силикат алюминия, содержащий способные к обмену катионы (зачастую это ионы натрия). В водных суспензиях бентонит ведет себя как маленькие пластинки нерастворимого силиката с очень большой площадью поверхности (около 750 $м^2/г$), несущие отрицательный заряд. Бентонит является селективным адсорбентом белка, и эта адсорбция является следствием действия сил притяжения между положительно заряженными белками и отрицательно заряженным силикатом. Частица бетонита, покрытая адсорбированным белком, обычно адсорбирует на белок или вместе с белком некоторые фенольные таннины [51]. Бентонит используется как оклеивающее средство в производстве вин в целях предотвращения осаждения белка. Его дозировка в несколько фунтов на тысячу галлонов* обычно снижает содержание белка в вине с 50–100 мг/л до стабильного уровня менее чем 10 мг/л. Бентонит быстро формирует тяжелый компактный осадок, и поэтому зачастую его применяют в сочетании с финишным фильтрованием, при котором осажденные коллоиды удаляются.

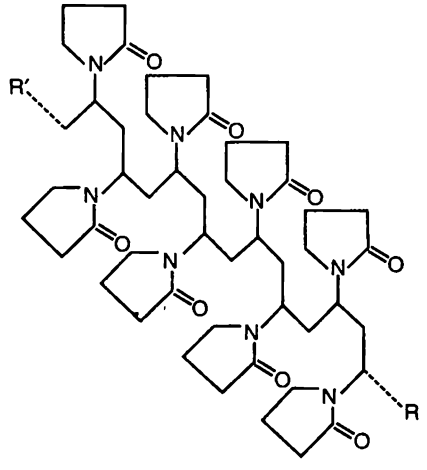
К важным осветляющим веществам, обладающим селективным сродством к таннинам, проантоцианидинам и другим полифенолам, относятся белки и некоторые синтетические смолы, в частности, полиамиды и поливинилпирролидон (ПВП, *PVP*). Чаще всего для осветления напитков используют желатин и рыбий клей, получаемый из плавательного пузыря рыб. Наиболее важным типом связывания таннинов и белков, хотя и не единственным, является образование водородной связи между фенольными гидроксильными группами и амидными связями в белках. Добавление к яблочному соку небольшого коли-

*1 фунт = 453,6 г; американский галлон = 3,78 л. — *Примеч. перев.*

чества желатина (40–170 г/380 л) вызывает агрегацию и осаждение желатино-таннинового комплекса, который при осаждении захватывает и удаляет другие взвешенные частицы. Точное количество желатина в каждом конкретном случае следует определять в ходе обработки. В соки с небольшим содержанием полифенольных соединений для облегчения флокуляции желатина следует добавить дополнительное количество таннина или танниновой кислоты (0,005–0,01%).

В низких концентрациях желатин и другие растворимые осветлители действуют как защитные коллоиды, в более высоких концентрациях они вызывают осаждение, а в еще более высоких концентрациях они к осаждению не приводят. Растворимость коллоидных осветлителей обусловлена образованием водородных связей между их молекулами и водой. Молекулы осветлителя и полифенолов могут объединяться в разных пропорциях, либо нейтрализуя, либо усиливая гидратацию и растворимость данной коллоидной частицы. Наиболее полное осаждение дает почти полное разрушение водородных связей между водой и белком либо полифенолом, и это происходит до тех пор, пока количество растворенного осветлителя примерно равно массе таннинов, выводящихся из системы.

Синтетические смолы (полиамиды и ПВП) используют для предотвращения потемнения белых вин [6] и для удаления мути из пива [12]. Эти полимеры поставляются как в растворимой, так и в нерастворимой форме, но требования к незначительному остаточному содержанию или полному отсутствию данного полимера в напитках стимулировали использование перекрестносшитых высокомолекулярных нерастворимых форм. Особенно эффективными оказались синтетические смолы в пивоварении, где серьезными проблемами являются индуцированное холодом обратимое помутнение («холодная муть») и необратимое помутнение (связанное с развитием побочного кислого привкуса). Эти виды мути обусловлены образованием комплексов между нативными белками и проантоцианидинами ячменного солода. Избыточное удаление белков дает плохое качество пены, однако селективное удаление полифенолов повышает стабильность пива. Первоначально в этих целях использовали полиамиды («Найлон 66»), но более высокой эффективности удалось достичь с помощью поперечносшитого ПВП. Обработка 100 баррелей пива* 1,4–2,3 кг нерастворимого ПВП обеспечивает контроль «холодной мути» и повышает стабильность пива при хранении [12]. ПВП вносят после стадии брожения перед стадией фильтрования, и он быстро адсорбирует полифенолы. Аналогично тому, как бентонит удаляет некоторые таннины вместе с преимущественно адсорбируемым белком, селективные адсорбенты таннина вместе с фенольными смолами удаляют некоторые белки.



Поливинилпирролидон (ПВП)

Помимо рассмотренных выше адсорбентов для осветления используют также активированный уголь и некоторые другие вспомогательные материалы. Активированный уголь достаточно реакционноспособен, но вместе с более крупными соединениями, участвующими в образовании мути, он адсорбирует значи-

* 1 баррель = 159 л. — *Примеч. перев.*

тельные количества более мелких молекул ароматизаторов и красящих веществ. Для осаждения белков применяют также дубильную кислоту (таннин), но теоретически ее внесение может приводить к описанным выше нежелательным эффектам. Способностью селективно адсорбировать полифенолы обладают и другие низкорастворимые (кератин, казеин и зеин) и растворимые белки (казеинат натрия, яичный альбумин), но они до сих пор не нашли широкого применения.

11.15. Отбеливатели муки и хлебопекарные улучшители

Свежемолотая пшеничная мука имеет бледно-желтую окраску и дает клейкое тесто, которое трудно замешивать и выпекать. При хранении мука постепенно белеет и «созревает», а ее хлебопекарные свойства улучшаются. Для ускорения этих естественных процессов обычно применяют химические методы обработки [54] и внесение добавок, улучшающих разрыхляющие свойства дрожжей и замедляющие черствение.

При отбеливании муки происходит окисление каротиноидных пигментов, что приводит к разрушению их системы сопряженных двойных связей с образованием менее конъюгированной бесцветной системы. Улучшающее действие на тесто окислителей связано с окислением сульфгидрильных групп белков клейковины. Применяемые окислители могут участвовать или только в отбеливании, или в отбеливании и в улучшении хлебопекарных свойств теста, а также только в улучшении хлебопекарных свойств. Один из популярных отбеливателей муки — пероксид бензоила $[(C_6H_5CO)_2O_2]$ — обладает свойствами отбеливателя, но не улучшает хлебопекарные свойства. К веществам, действующим и как отбеливатели, и как улучшители, относятся газообразный хлор (Cl_2), диоксид хлора (ClO_2)*, нитрозилхлорид (NOCl) и оксиды азота (диоксид NO_2 и тетроксид N_2O_4)** [43]. Эти газообразные окислители действуют сразу же при контакте с мукой. Окислители, служащие прежде всего для улучшения хлебопекарных свойств, действуют на стадии тестообразования, а не на муку. К этой группе относятся бромат и йодат калия ($KBrO_3$ и KIO_3), йодат кальция $[Ca(IO_3)_2]$ и пероксид кальция (CaO_2)**.

Пероксид бензоила обычно добавляют к муке (0,025–0,075%) при помоле. Он поставляется обычно в порошковой форме и вносится вместе с разбавителями или стабилизаторами (сульфатом кальция, карбонатом магния, двузамещенным фосфатом кальция и алюмофосфатом натрия). Пероксид бензоила является инициатором образования свободных радикалов (см. главу 4), и после внесения ему требуется несколько часов для разложения на свободные радикалы и инициации окисления каротиноидов.

Газообразные окислители муки дают разную степень отбеливания, но эффективно улучшают ее хлебопекарные свойства. Обработка диоксидом хлора лишь незначительно отбеливает муку, на зато существенно облегчает тестоподготовку. Газообразный хлор, зачастую с небольшим количеством нитрозилхлорида, широко применяется как отбеливатель и улушитель муки из мягкой пшеницы, используемой в производстве мучных кондитерских изделий. В результате окисления хлора образуется хлористоводородная кислота, а результирующие пониженные значения pH обусловливают более высокое качество выпекаемых изделий. Тетроксид (N_2O_4) и другие оксиды азота, образующиеся при пропускании воздуха через сильный дуговой разряд, среднеэффективны как отбеливатели, но придают обработанной ими муке хорошие хлебопекарные свойства.

Окислители, используемые преимущественно для улучшения хлебопекарных свойств, обычно вносят в муку при помоле (10–40 мг/кг), но иногда их добавляют в смесь улучшителей, содержащую несколько неорганических солей, и вносят в тесто уже в пекарне. Бромат калия, традиционно используемый в качестве улучшителя, нереакционноспособен до тех пор, пока в ходе брожения дрожжей значение pH теста не понизится до требуемого для его активации. В результате он начинает действовать довольно поздно и обусловливает увеличение объема буханки, ее более симметричную форму, а также более высокие качество мякиша и текстуру изделия.

Прежде считалось, что улучшение хлебопекарных свойств благодаря обработке окислителями можно отнести на счет ингибирования протеолитических ферментов муки. В настоящее же время общепризнано, что улучшители теста окисляют сульфгидрильные группы (–SH) клейковины (глютена) в нужное

* В Европе и РФ не применяются. — *Примеч. науч. ред.*

** В мировой практике не применяются. — *Примеч. науч. ред.*

время с образованием большего числа межмолекулярных дисульфидных связей (–S–S–). Формирование этих перекрестных сшивок позволяет белкам клейковины образовывать тонкие, липкие сети белковых пленок с заполеннными газом полостями. В результате получается более крутое, сухое и эластичное тесто с более рыхлой структурой мякиша и более высоким качеством готовых изделий. При этом следует избегать чрезмерного окисления муки, так как это снижает качество продукции, делает мякиш более серым, снижает объемом буханки и ухудшает ее текстуру. В последнее время все шире применяется добавление к пшеничной муке для дрожжевого теста небольших количеств соевой муки. Добавление соевой липоксигеназы (см. главы 4 и 6) является удобным способом инициировать свободнорадикальное окисление каротиноидов [15]. Кроме того, добавление соевой липоксигеназы существенно улучшает реологические свойства теста, но механизм этого явления еще не изучен. Помимо того, что в окислении –SH-групп клейковины участвуют липидные гидропероксиды, экспериментальные данные свидетельствуют, что в улучшении хлебопекарных свойств теста задействованы и другие типы взаимодействий между белком и липидами [15].

К неорганическим солям, входящим в состав улучшителей теста, относятся хлорид аммония (NH_4Cl), сульфат аммония [$(NH_4)_2SO_4$], сульфат кальция ($CaSO_4$), фосфат аммония [$(NH_4)_3PO_4$] и фосфат кальция ($CaHPO_4$). Их вносят в тесто для усиления роста дрожжей и в качестве вспомогательного средства для контроля pH. Соли аммония — это готовый источник азота для роста дрожжей. Фосфорные соли улучшают тесто путем буферизации pH на уровне несколько ниже нормального значения, что особенно важно при использовании воды со щелочной жесткостью.

В хлебопекарной промышленности в качестве улучшителей используют и другие виды добавок. Так, для улучшения замеса и увеличения объема изделия используют стеароил-2-лактилат кальция (рис. 11.25) и аналогичные эмульгирующие агенты в низких концентрациях (до 0,5%) [56]. Гидроколлоидные камеди в хлебопекарной промышленности применяют для улучшения ВУС теста и для модификации других свойств теста и хлебобулочных изделий [34]. К наиболее полезным для хлебопечения гидроколлоидам относятся каррагинан, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), камедь бобов рожкового дерева (КБРД) и метилцеллюлоза. Метилцеллюлоза и КМЦ замедляют процессы ретроградации крахмала и черствения изделий, а также замедляют миграцию влаги к поверхности изделия в ходе хранения. Каррагинан (0,1%) размягчает мякиш сладких мучных изделий. Некоторые гидроколлоиды (например, КМЦ в концентрации 0,25%) можно вносить в состав теста для пончиков (пышек) для существенного снижения содержания жира, впи-

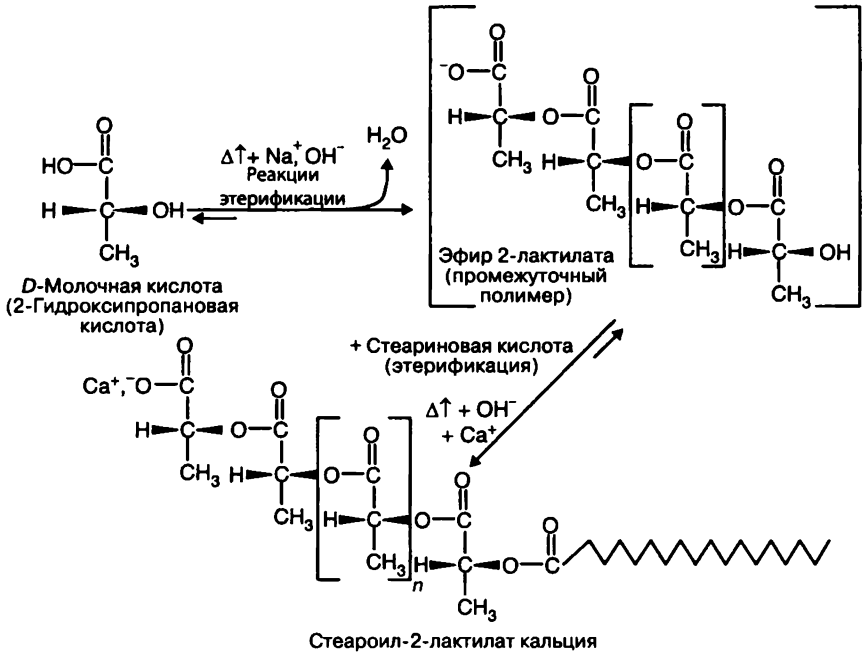


Рис. 11.25. Реакции получения эмульгаторов на основе стероил-2-лактилата

тываемого при жарке во фритюре. Этот полезный эффект обусловлен улучшением качества теста, а также тем, что на поверхности тестовых заготовок образуется эффективный гидратированный барьер.

11.16. Антислеживатели

Для поддержания сыпучих свойств гранулированных и порошкообразных пищевых продуктов, по своей природе являющихся гигроскопичными, применяют особые добавки. Как правило, их действие обусловлено быстрым поглощением избыточной влаги, образованием на частицах гидрофобного покрытия или функциями нерастворимого твердого разбавителя. Для предотвращения комкования пекарских порошков и столовой соли применяют силикат кальция ($CaSiO_3$ x H_2O в концентрации до 5 и 2% соответственно). Мелкодисперсный силикат кальция поглощает влагу в количествах, в 2,5 раза превышающих его массу, оставаясь при этом сыпучим. Помимо поглощения влаги силикат кальция эффективно поглощает жиры и другие неполярные органические соединения, что делает его удобным для использования в сложных порошковых смесях и в некоторых специях, содержащих свободные эфирные масла.

Пищевые кальциевые и магниевые соли высокомолекулярных жирных кислот твердого животного жира используют в качестве улучшителей а производстве обезвоженных овощных продуктов, столовой соли, луковой и в чесночной соли и в составе многих других пищевых порошкообразных ингредиентов и смесей. К порошкообразным пищевым продуктам часто добавляют стеарат кальция в целях предотвращения комкообразования и обеспечения свободного перемещения в ходе технологической переработки, а также для предотвращения слеживания при хранении готового продукта. Стеарат кальция практически не растворим в воде, но хорошо сцепляется с твердыми частицами и служит им своего рода водоотталкивающим покрытием. Промышленно выпускаемые порошки стеарата характеризуются высокой насыпной плотностью (около 27 кг/м^3) и большой площадью поверхности, что делает их применение в качестве улучшителей (0,5–2,5%) достаточно экономным. Стеарат кальция также используется (1%) в производстве таблетированной ледецовой карамели в качестве своего рода «смазки».

К другим антислеживателям, применяемым в пищевой промышленности, относятся алюмосиликат натрия, трехзамещенный фосфат кальция (ортофосфат кальция), силикат магния и карбонат магния, которые фактически не растворимы в воде и обладают разными характеристиками относительно поглощения влаги. Их дозировка та же, что и у других антислеживающих веществ (например, в сахарной пудре — около 1% алюмосиликата натрия). Порошковую микрокристаллическую целлюлозу используют для предотвращения комкования тертого или нарезанного стружкой сыра. В тех концентрациях, которые применяются в пищевой промышленности, антислеживатели либо метаболизируются (крахмал, стеараты), либо не обладают токсическим действием [19].

11.17. Газы и пропелленты

Газы, как реакционноспособные, так и инертные, играют важную роль в пищевой промышленности. Водород, например, используется для гидрогенизации ненасыщенных жиров (см. главу 4), хлор применяется для отбеливания муки* (см. выше раздел 11.15) и для дезинфекции оборудования, SO_2 — для ингибирования ферментативного потемнения сухофруктов (см. раздел 11.7.1), газообразный этилен — для ускорения созревания плодов (см. главу 17), этиленоксид — для стерилизации специй и пряностей (см. раздел 1.7.11), а воздух — для формирования окраски спелых оливок. Ниже мы рассмотрим функции и свойства практически инертных газов, используемых в производстве пищевых продуктов.

11.17.1. Защита от кислорода

Для заполнения свободного пространства над продуктом в упаковке, для барботирования жидкости или для создания защитного слоя вокруг продукта в ходе или после технологической обработки применяют определенные способы удаления кислорода с помощью инертных газов, в частности азота или диоксида углерода. Последний не является химически инертным веществом, так как он растворим воде и может придавать некоторым продуктам резкий карбонизированный привкус. Способность диоксида углерода,

* В Европе и РФ не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

который тяжелее воздуха, создавать плотный, газообразный защитный слой над продуктом делает его привлекательным для применения во многих технологиях. Создание азотного защитного слоя требует тщательной продувки азотом с последующим созданием небольшого избыточного давления, предотвращающего ускоренную диффузию воздуха в эту систему. Тщательно продутый азотом и герметически упакованный продукт обычно более стоек к окислительной порче [30].

11.17.2. Карбонизация

Введение в напитки (газированные безалкогольные напитки, пиво, некоторые вина и фруктовые соки) диоксида углерода (карбонизация) делает их шипучими и придает им резкий привкус, кислинку и в некоторой степени даже текстуру. Количество и способы введения CO_2 широко варьируют в зависимости от типа продукта [30]. Например, пиво в процессе брожения уже частично карбонизируется, но его дополнительно карбонизируют перед розливом. В объеме пива при 16 °С и давлении 1 атм обычно содержится 3–4 объема газообразного CO_2). Чтобы повысить растворимость диоксида углерода, карбонизацию зачастую проводят при пониженных температурах (4 °С) и повышенном давлении. В других газированных напитках содержится от 1,0 до 318 объемов диоксида углерода в зависимости от требуемого эффекта. Удержание больших количеств диоксида углерода в растворах при атмосферном давлении принято относить на счет его поверхностной адсорбции коллоидами и сил химического связывания. Известно, что в некоторых продуктах путем быстро протекающих обратимых реакций между диоксидом углерода и свободными аминогруппами аминокислот и белков образуются карбаминовые соединения. Кроме того, стабилизации системы диоксида углерода способствует также образование угольной кислоты (H_2CO_3) и бикарбонатных ионов (HCO^-_3). Спонтанное высвобождение из пива диоксида углерода (так называемый гашинг-эффект, сопровождающийся бурным пенообразованием) объясняется действием следовых количеств примесей металлов и присутствием кристаллов оксалата, действующих как активные зародыши образования газовых пузырьков.

11.17.3. Пропелленты

Некоторые жидкие пищевые продукты и напитки реализуют как жидкости, пены или спреи из находящихся под давлением аэрозольных упаковок (емкостей). Поскольку пропеллент обычно контактирует с пищевым продуктом, он неизбежно становится пищевым компонентом. Основными пропеллентами в этом случае служат закись азота, азот и диоксид углерода [30]. Пены и спреи обычно диспенсируются закисью азота и диоксидом углерода, поскольку эти пропелленты достаточно хорошо растворимы в воде, а их расширение в процессе дозирования способствует образованию спрея или пены. Диоксид углерода используется для диспенсирования таких продуктов, как сырные спреды, где допускается острота и кислотность. Благодаря низкой водо- и жирорастворимости азота его используют для дозирования тех жидких продуктов, где желательно избегать вспенивания, например, кетчупа, растительных масел и сиропов. Использование всех этих газов в пищевых продуктах регламентируется, причем давление не должно превышать 100 фунтов/кв. дюйм (около 689,5 кПа) при 21 °С или 135 фунтов/кв. дюйм (930,8 кПа) при 54 °С. В этих условиях ни один из газов не переходит в жидкое состояние, и значительная часть емкости занята пропеллентом. При диспенсировании давление падает, что может вызывать затруднения в полноте дозирования и нарушить гомогенность продукта. Газообразные пропелленты нетоксичны, негорючи, экономичны и обычно не дают нежелательных привкусов и не приводят к изменению цвета продукта (при использовании только диоксида углерода он иногда придает некоторым продуктам нежелательный побочный привкус).

Жидкие пропелленты разрешены к применению в пищевой промышленности, но по экологическим соображениям, связанным с возможным истощением озонового слоя, применение хлорфторуглеродов запрещено. Прежде жидкими пропеллентами, разрешенными к применению в пищевых продуктах, были октафторциклобутан (фреон С-318, $CF_2–CF_2–CF_2–CF_2$) и пентафтормонохлорэтан (фреон 115, $CClF_2–CF_3$). В качестве газов-пропеллентов для аэрозолей на основе растительных масел и кулинарных спреев в виде эмульсий на водной основе применяются горючие углеводороды — пропан, бутан и изобутан, хотя теоретически они являются опасными веществами. При использовании часть пропеллента находится над пищевым продуктом в виде жидкого слоя, и имеется соответствующее свободное пространство с испаряющимся пропеллентом. Использование сжиженного пропеллента позволяет вести дозирование

при постоянном давлении, но для этого содержимое необходимо сначала встряхнуть, чтобы образовалась эмульсия, которая при высвобождении из контейнера будет вспениваться или распыляться. Для аэрозолей распылительного типа следует вести диспенсирование под постоянным давлением. Эти пропелленты в обнаруживаемых концентрациях нетоксичны и не дают посторонних привкусов. Они обладают очень хорошими пенообразующими свойствами, так как хорошо растворяются в любых присутствующих жирах и эффективно образуют эмульсии.

11.18. Сводная таблица добавок

Обобщенные данные по различным классам пищевых добавок и их функциям в пищевых продуктах сведены в табл. 11.5.

Таблица 11.5
Классы и функции пищевых добавок. По [9, 16, 17, 21, 28, 36]

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
I. **Технологические добавки***			
Разрыхлители и пенообразователи (могут использоваться и как пищевые добавки)**	Диоксид углерода	Карбонизация, пенообразование	11
	Азот	Пенообразование	11
	Бикарбонат натрия	То же	11
Пеногасители (лауриновая, олеиновая, пальмитиновая кислоты, стеараты, диметилполисилоксан, минеральное масло и диоксид кремния могут использоваться и как пищевые добавки)	Стеарат алюминия	Производство дрожжей	—
	Стеарат аммония	Производство свекловичного сахара	—
	Бутилстеарат	Производство свекловичного сахара и дрожжей	—
	Декановая кислота	То же	—
	Диметилполисилоксан	Общее применение	—
	Диметилполисиликон	То же	—
	Лауриновая кислота	Производство свекловичного сахара и дрожжей	—
	Минеральное масло	То же	—
	Олеиновая кислота	Общее применение	
	Оксистеарин	Производство свекловичного сахара и дрожжей	—
	Пальмитиновая кислота	То же	—
	Нефтяной парафин	— “	—
	Диоксид кремния	Общее применение	—
	Стеариновая кислота	Производство свекловичного сахара и дрожжей	—
Катализаторы, в том числе ферменты	Никель	Гидрогенизация жиров	4
	Амилаза	Осахаривание крахмала	3,6
	Глюкозооксидаза	Поглотитель кислорода	6
	Липаза	Формирование молочного аромата	6
	Папаин	Обеспечение качества охлажденного пива	6
	Пепсин	Тендеризация мяса	6
	Реннин	Производство сыра	6

* В РФ преимущественно обозначаются как технологические вспомогательные средства, которые не относятся к пищевым добавкам, но в ряде случаев указанные вещества могут использоваться и как пищевые добавки, то есть входить в состав пищевого продукта. — *Примеч. науч. ред.*

** Здесь и далее в этой таблице уточнения в скобках сделаны научным редактором данной главы.

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Осветлители и флокулянты	Бентонит	Абсорбирует белки	11
	Желатин	Образует комплексы с полифенолами	11
	Поливинилпирролидон	То же	11
	Дубильная кислота	— " —	11
Регуляторы цвета (применяются как пищевые добавки — фиксаторы (стабилизаторы) окраски)	Глюконат железа	Производство черных оливок	—
	Хлорид магния	Производство консервированного зеленого горошка	9
	Нитрат, нитрит (калия, натрия)	Производство соленых мясных продуктов	9,11
	Эриторбат натрия	Формирование цвета посоленных мясных продуктов	9
Хладагенты	Диоксид углерода	—	11
	Жидкий азот	—	—
Технологические добавки для солодоращения и брожения	Хлорид аммония	Нутриенты для дрожжей	11
	Фосфат аммония	—	—
	Сульфат аммония	—	
	Карбонат кальция	—	—
	Фосфат кальция	—	
	Фосфат кальция (двухосновный)	—	—
	Сульфат кальция	—	—
	Хлорид калия	—	—
	Фосфат калия	—	—
Технологические добавки для хранения и транспортировки сырья и продуктов (применяются и как пищевые добавки (кроме фосфата алюминия) в качестве антислеживающих агентов)	Фосфат алюминия	Антислеживающие свойства	11
	Силикат кальция	То же	11
	Стеарат кальция	— " —	11
	Двузамещенный фосфат кальция	— " —	11
	Двузамещенный фосфат магния	— " —	11
	Каолин	— " —	11
	Силикат магния	— " —	—
	Стеарат магния	— " —	—
	КМЦ натрия	Загущение, увеличение объема	11
	Алюмосиликат натрия	Антислеживающие свойства	11
	Крахмалы	То же	3
	Трехзамещенный фосфат кальция	— " —	11
	Трехзамещенный силикат кальция	— " —	12
	Ксантановая и другие камеди	Загущение, увеличение объема	3, 11
Окислители (бензоилпероксид и диоксид серы могут применяться как пищевые добавки)	Пероксиды ацетона	Инициация образования свободных радикалов	11
	Бензоилпероксид	То же	11
	Пероксид кальция	— " —	11
	Пероксид водорода	— " —	—
	Диоксид серы	Обесцвечивание сухих фруктов	11

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Регуляторы кислотности и модификаторы			
Подкислители (кислоты) (применяются и в качестве пищевых добавок)	Уксусная кислота	Противомикробное действие	11
	Лимонная кислота	Образование хелатных комплексов	4,11
	Фумаровая кислота	Противомикробное действие	11
	δ-Глюконолактон	Разрыхляющие свойства	11
	Хлористоводородная кислота		11
	Молочная кислота		11
	Яблочная кислота	Образование хелатных комплексов	11
	Фосфорная кислота	—	11
	Кислый тартрат калия	Разрыхляющие свойства	11
	Янтарная кислота	Образование хелатных комплексов	11
	Винная кислота	То же	11
Щелочи (основания) (применяются и в качестве пищевых добавок)	Бикарбонат аммония	Источник диоксида углерода	11
	Гидроксид аммония		
	Карбонат кальция	—	—
	Карбонат магния	—	
	Карбонат калия	Источник диоксида углерода	
	Гидроксид калия		
	Бикарбонат натрия	Источник диоксида углерода	11
	Карбонат натрия	—	—
	Цитрат натрия	Эмульгирование	11
	Трехзамещенный цитрат натрия	Эмульгирование	11
Буферные соли (применяются и в качестве пищевых добавок)	Монофосфат аммония (двухосновный)	—	11
	Цитрат кальция	—	—
	Глюконат кальция	—	—
	Монофосфат кальция (двухосновный)	—	
	Кислый тартрат калия	—	
	Цитрат калия	—	—
	Монофосфат калия (двухосновный)	—	—
	Ацетат натрия	—	—
	Кислый пирофосфат натрия	—	—
	Цитрат натрия		—
	Фосфат натрия (моно-, двух-, трехосновный)	—	
	Тартрат натрия-калия	—	—
Антиадгезивы	Ацилированные моноацилглицерины	—	4, 11
	Пчелиный воск	—	4, 11
	Стеарат кальция	—	4, 11
	Силикат магния	—	4, 11
	Минеральное масло		—

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Антиадгезивы	Моно- и диацилглицерины	Эмульгаторы	4
	Крахмалы		3
	Стеариновая кислота		4,11
	Тальк		
Дезинфектанты и фумигаторы	Хлор	Окислитель	
	Метилбромид	Фумигант	
	Гипохлорит натрия	Окислитель	
Технологичесие добавки для сепарирования и фильтрования	Диатомовая земля		
	Ионообменная смола		
	Силикат магния		
Растворители, носители и инкапсулирующие вещества (агар, арабиногалактан, целлюлоза, глицерин, гуаровая камедь, пропиленгликоль и триэтилцитрат могут использоваться в качестве пищевых добавок-носителей)	Ацетон	Растворитель	
	Агар-агар	Инкапсулирование	3
	Арабиногалактан	То же	3
	Целлюлоза	Носитель	3
	Глицерин	Растворитель	4,11
	Гуаровая камедь	Инкапсулирование	3
	Метиленхлорид	Растворитель	
	Пропиленгликоль	То же	11
	Триэтилцитрат		
Добавки к моющим средствам	Додецилбензолсульфонат натрия	Детергент	
	Гидроксид натрия	Щелочная мойка	
II. Добавки к готовым продуктам (В РФ обозначаются как пищевые добавки)			
Противомикробные средства (этиленоксид и пропиленоксид не применяются)	Уксусная кислота и ее соли	Антибактериальное и антидрожжевое действие	11
	Бензойная кислота и ее соли	То же	11
	Этиленоксид	Универсальное стерилизующее действие	11
	Алкиловые эфиры пара-гидроксибензоата	Противоплесневое и антидрожжевое действие	11
	Нитраты, нитриты (K, Na)	Уничтожение *C. botulinum*	9, 11
	Пропионовая кислота и ее соли	Противоплесневое действие	11
	Пропиленоксид	Универсальное стерилизующее действие	11
	Сорбиновая кислота и ее соли	Антибактериальное, антидрожжевое и противоплесневое действие	11
	Диоксид серы и сульфиты	Добавки широкого действия	11
Антиоксиданты (тиодипропионовая кислота и ее эфиры не применяются)	Аскорбиновая кислота (и ее соли)	Восстановитель	4, 7
	Аскорбилпальмитат	Восстановитель	11
	БГА	Разрыв цепи свободных радикалов	4, 11
	БГТ	То же	4, 11
	Гваяковая смола	— "	4, 11
	Пропилгаллат		4, 11
	Сульфиты и метабисульфиты	Восстановители	4, 11
	Тиодипропионовая кислота (и ее эфиры)	Перкислотный деструктор	11

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Добавки для регулирования внешнего вида изделий			
Красители и модификаторы цвета (эритрозин в Российской Федерации не применяется)	Аннато	Сыр, масло, хлебобулочные изделия	9
	Свекольный порошок	Глазирование, безалкогольные напитки	9
	Карамельный колер	Кондитерские изделия	9
	Каротин	Маргарин	9
	Экстракт кошенили	Напитки	9
	FD&C № 3	Мятное желе, напитки	9
	FD&C № 3 (эритрозин)	Баночные фруктовые коктейли	9
	Диоксид титана	Белые конфеты, итальянские сыры	9
	Куркума	Солености, соусы	9
Прочие вещества (сахароза не относится к пищевым добавкам)	Пчелиный воск	Придание блеска, полирование	4
	Глицерин	То же	4
	Олеиновая кислота	— " —	4
	Сахароза	Сахарная глазурь	3
	Карнаубский воск	Придание блеска, полирование	—
Ароматизаторы и модификаторы вкуса			
Вкусоароматические вещества *	Эфирные масла	Общего действия	10
	Травы и специи	То же	10
	Растительные экстракты	— "	10
	Синтетические вкусоароматические соединения	— " —	
Усилители вкуса (хлорид натрия к пищевым добавкам) не относится	Гуанилат натрия, двузамещенный	Мясные продукты и овощи	10
	Инозинат натрия, двузамещенный	То же	10
	Мальтит	Хлебобулочные и кондитерские изделия	10
	Глутамат натрия	Мясные продукты и овощи	10
	Хлорид натрия	Общего действия	
Влагоудерживающие вещества (инвертный сахар к пищевым добавкам не относится)	Глицерин	Пластификатор, увлажнитель	3, 10
	Гуммиарабик	—	
	Инвертный сахар		3
	Пропиленгликоль	—	10
	Маннит	—	3, 10
	Сорбит		3, 10
*Нутритивные БАВ***			
Аминокислоты	Аланин		5
	Аргинин	Эссенциальная	5
	Аспарагиновая кислота	—	5
	Цистеин	—	5
	Цистин	—	5
	Глютаминовая кислота		5
	Гистидин	—	5

* Представителей вкусоароматизирующих веществ слишком много. Подробнее о них см. работы [21, 28]. — *Примеч. автора.*

* Пищевые вещества — аминокислоты, витамины и минеральные вещества, а также другие нутриенты — в мировой практике к пищевым добавкам не относят. — *Примеч. науч. ред.*

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Аминокислоты	Изолейцин	Эссенциальная аминокислота	5
	Лейцин	То же	5
	Лизин	— " —	5
	Метионин	— "	5
	Фенилаланин	— "	5
	Пролин	—	5
	Треонин	Эссенциальная аминокислота	5
	Валин	То же	5
Минеральные вещества	Борная кислота	Источник бора	8
	Карбонат кальция	Сухие зерновые завтраки	8
	Цитрат кальция	Кукурузная мука	8
	Фосфаты кальция	Обогащенная мука	
	Пирофосфат кальция	То же	8
	Сульфат кальция	Хлебобулочные изделия	8
	Карбонат кобальта	Источник кобальта	8
	Хлорид кобальта	То же	8
	Хлорид меди	Источник меди	8
	Глюконат меди	То же	8
	Оксид меди	" —	8
	Фторид кальция	Фторирование воды	
	Фосфат железа (III)	Источник железа	8
	Пирофосфат железа (III)	То же	8
	Глюконат железа (II)	— " —	8
	Сульфат железа (II)	— " —	8
	Йод	Источник йода	8
	Йодид, содержащий одновалентную медь	Столовая соль	8
	Йодат, калиевый	Источник йода	8
	Хлорид магния	Источник магния	8
	Оксид магния	То же	8
	Фосфаты магния	— " —	8
	Сульфат магния	— " —	8
	Цитрат марганца	— "	8
	Оксид марганца	— " —	8
	Молибдат аммония	Источник молибдена	8
	Сульфат никеля	Источник никеля	8
	Фосфаты кальция	Источник фосфора	8
	Фосфаты натрия	То же	8
	Хлорид калия	Заменитель NaCl	—
	Хлорид цинка	Источник цинка	8
	Стеарат цинка	То же	8
Витамины	*пара*-Аминобензойная кислота	Действующее начало витаминов группы В	7
	Биотин	—	7

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Витамины	Каротин	Провитамин А	7
	Фолиевая кислота		7
	Ниацин	—	7
	Ниацинамин	Обогащение муки	7
	Пантотенат, кальций	Витамин В-комплекса	7
	Пиридоксина гидрохлорид	То же	7
	Рибофлавин	— "	7
	Тиамина гидрохлорид	Витамин B_1	7
	Токоферола ацетат	Витамин Е	7
	Витамина А ацетат		—
	Витамин B_{12}	—	7
	Витамин D		7
Прочие нутриенты	Бетаина гидрохлорид	БАД	7
	Холинхлорид	То же	7
	Инозитол	— " —	7
	Линолевая кислота	Эссенциальная жирная кислота	4
	Рутин	БАД	7
Секвестранты (комплексообразователи)*	Цитрат кальция	—	11
	Кальций-динатрий ЭДТА	—	11
	Глюконат кальция		—
	Фосфат кальция (одноосновный)	—	—
	Лимонная кислота	—	11
	Двунатриевая ЭДТА	—	11
	Фосфорная кислота		11
	Цитрат калия		
	Фосфат калия (одно-, двухосновный)	—	
	Кислый пирофосфат натрия	—	8, 11
	Цитрат натрия		11
	Глюконат натрия	—	—
	Гексаметафосфат натрия	—	—
	Фосфат натрия (одно-, двух-, трехосновный)	—	—
	Тартрат натрия-калия		—
	Тартрат натрия		—
	Триполифосфат натрия	—	8, 11
	Винная кислота	—	—
Специфические эмульгаторы и стабилизаторы (в качестве пищевых добавок не применяются)	Бромированное растительное масло	Эмульгирование капель масла	11
Регуляторы поверхностного натяжения	Диоктила натрия сульфосукцинат	—	—
	Экстракт бычьей желчи**	—	—
	Фосфат натрия (двухосновный)	—	

* В РФ комплексообразователи относятся к антиокислителям. — *Примеч. науч. ред.*

** Экстракт бычьей желчи в качестве пищевой добавки не применяется. — *Примеч. науч. ред.*

Таблица 11.5 (продолжение)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Подсластители			
Некалорийные	Ацесульфам К	—	10, 11
	Аммония сахарин		10, 11
	Кальция сахарин		10, 11
	Сахарин		10, 11
	Натрия сахарин		10, 11
Калорийные	Аспартам		10, 11
	Глюкоза*		3
	Сорбит	—	3, 11
Регуляторы текстуры и консистенции			
Эмульгаторы и эмульгирующие соли (холевая кислота, дезоксихолевая кислота, лактилированные эфиры жирных кислот, экстракт бычьей желчи, таурохолевая кислота в качестве пищевых добавок не применяются)	Стеароил-2-лактилат кальция	Сухой яичный белок, хлебопечение	4, 11
	Холевая кислота	Сухой яичный белок	4
	Дезоксихолевая кислота	То же	4
	Диоктил натрия сульфосукцинат	Широкого действия	
	Жирные кислоты (C_{10}–C_{18})	То же	4
	Лактиловые эфиры жирных кислот	Шортенинги	4, 11
	Лецитин	Широкого действия	4
	Моно- и диацилглицерины	То же	4
	Экстракт бычьей желчи	" —	
	Эфиры полиглицерола	" —	11
	Полиоксиэтиленовые эфиры сорбита	" —	4, 11
	Пропиленгликоль, моно- и диэфиры		4
	Фосфат калия трехосновный	Плавленые сыры	11
	Полиметабисульфит калия		—
	Пирофосфат калия	Плавленый сыр	11
	Алюмосульфат натрия	Широкого действия	11
	Цитрат натрия	Плавленые сыры	11
	Метафосфат натрия	Широкого действия	11
	Фосфат натрия двухосновный	Плавленые сыры	11
	Фосфат натрия одноосновный	То же	11
	Фосфат натрия трехосновный	" —	11
	Пирофосфат натрия	Широкого действия	11
	Сорбитан моноолеат	Диетические продукты	4
	Сорбитана монопальмитат	Вкусоароматическая дисперсия	4
	Сорбитана моностеарат	Общая	4
	Сорбитана тристеарат	Кондитерские глазури	4
	Стеароил-2-лактилат	Хлебопекарные шортенинги	4
	Стеароилмоноглицеридил-цитрат	Шортенинги	4
	Таурохолевая кислота	Яичные белки	4

* Глюкоза к пищевым добавкам не относится. — *Примеч. науч. ред.*

Таблица 11.5 (окончание)

Класс и общая функция	Химическое название	Дополнительные функции	Глава или раздел данной книги
Отверждающие добавки (в РФ называются «уплотнителями»)	Сульфаты алюминия (квасцы)	Соленые и маринованные овощи	11
	Карбонат кальция	Широкого действия	11
	Хлорид кальция	Консервированные томаты	11
	Цитрат кальция	То же	11
	Глюконат кальция	Ломтики яблок	11
	Гидроксид кальция	Ломтики фруктов	11
	Лактат кальция	Ломтики яблок	11
	Фосфат кальция, одноосновный	Консервированные томаты	11
	Сульфат кальция	Консервированные картофель и томаты	11
	Хлорид магния	Консервированный зеленый горошек	9
Разрыхлители	Бикарбонат аммония	Источник диоксида углерода	11
	Фосфат аммония (двухосновный)	—	11
	Фосфат кальция		11
	δ-Глюконолактон		11
	Кислый пирофосфат натрия	—	11
	Алюмофосфат натрия		11
	Алюмосульфат натрия	—	11
	Бикарбонат натрия		11
Пластификаторы (в качестве пищевых добавок не применяются)	Парафин синтетический	Основа жевательной резинки	11
	Пентаэритритовый эфир канифоли	То же	11
Пропелленты	Диоксид углерода	—	11
	Закись азота		11
Стабилизаторы и загустители	Гуммиарабик	Стабилизатор пены	3, 11
	Агар	Мороженое	3, 11
	Альгиновая кислота	То же	3, 11
	Каррагинан	Шоколадные напитки	3, 11
	Гуаровая камедь	Сырные продукты	3, 11
	Гидроксипропилметилцеллюлоза	Широкого действия	3, 11
	Камедь рожкового дерева (КРД)	Салатные дрессинги	3, 11
	Метилцеллюлоза	Широкого действия	3, 11
	Пектин	Гелеобразование	3, 11
	Натрийкарбоксиметилцеллюлоза	Мороженое	3, 11
	Трагакантовая камедь	Салатные дрессинги	3, 11
Вещества, повышающие твердость изделий	Каррагинан	Широкого действия	3, 11
	Маннит	—	3, 11
	Пектин		3, 11
	Казеинат натрия		5
	Цитрат натрия	—	11
Маркеры	Диоксид титана	Наполнители для растительных белков	12

Дополнительная литература

Ash M., Ash I. *Handbook of Food Additives.* — 2nd ed. — NY: Endicott, 2002. — (Synapse Information Resources)
Burdock G. A. *Encyclopedia of Food and Color Additives.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1997.
Burdock G. A. (ed.). *Fenaroli 's Handbook of Flavor Ingredients.* — 5th ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
Davidson P. M, Sofos J. N., Branen A. L. (eds). *Antimicrobials in Food.* — 3rd ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.
Food Chemicals Codex / Food and Nutrition Board. — 3rd ed. — Washington, D.C.: National Research Council, National Academy Press, 1981
Gould G. W. *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures.* — London: Elsevier Applied Science, 1989.
Heath H. B. *Source Book of Flavors.* — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1981.
Lewis R. J., Sr. *Food Additives Handbook.* — NY: Van Nostrand Reinhold, 1989.
Molins R. A. *Phosphates in Food.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.
Nabors L. O., Geraldi R. C. (eds). *Alternative Sweeteners.* — 2nd ed. — NY: Marcel Dekker, 1991.
Phillips G. O., Wedlock D. J., Williams P. A. (eds). *Gums and Stabilizers for the Food Industry.* — Oxford: IRL Press; Oxford University Press, 1990.
Roller S. *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 2003.
Taylor R. J. *Food Additives.* — NY: John Wiley and Sons, 1980.
Wood R., Foster L., Damont A., Key P. *Analytical Methods for Food Additives.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.
Yannai S.. *Dictionary of Food Compounds.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.

Литература

1. Akoh C. C., Swanson B. G. (eds). *Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes.* — NY: Marcel Dekker, 1994. — P. 1–9.
2. Artz W. E., Hansen S. L. Other fat substitutes // *Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes* / C. C. Akoh, B. G. Swanson (eds.). — NY: Marcel Dekker, 1994. — P. 197–236.
3. Bakal G., Diaz A. Antimicrobial resistance: The lowdown on lauric arginate // *Food Qual.,* 2005, February-March, p. 54–61.
4. Brusick D., Cifone M., Young R., Benson S. Assessment of the genotoxicity of calcium cyclamate and cyclohexylamine // *Environ. Mol. Mutagen.,* 1989, 14, p. 188–199.
5. Bryan G. T., Erturk E. Production of mouse urinary bladder carcinomas by sodium cyclamate // *Science,* 1970, 167, p. 996–998.
6. Caputi A., Peterson R. G. The browning problem in wines // *Am. J. Enol. Vitic.,* 1965, 16(1), p. 9–13.
7. Chanamai R., McClements D. J. Impact of weighting agents and sucrose on gravitational separation of beverage emulsions // *J. Agric. Food Chem.,* 2000, 48, p. 5561–5565.
8. Chichester D. F., Tanner F. W. Antimicrobial food additives // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 115–184.
9. *Chemicals Used in Food Processing* / Committee on Food Protection, Food and Nutrition Board. — Publ. 1274. — Washington, D.C.: National Academy of Sciences Press, 1965. — 294 p.
10. Considine D. M. (ed.). Masticatory substances // *Foods and Food Production Encyclopedia.* — NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1982. — P. 1154–1155.
11. Crowell E. A., Guyman J. F. Wine constituents arising from sorbic acid addition, and identification of 2-ethoxyhexa-3,5-diene as source of geranium-like off-odor // *Am. J. Enol. Vitic.,* 1975, 26(2), p. 97–102.
12. Dahlstrom R. W., Sfat M. R. The use of polyvinylpyrrolidone in brewing // *Brewer's Dig.,* 1972, 47(5), p. 75–80.
13. Ellinger R. H. Phosphates in food processing // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 617–780.
14. Etchells J. L., Bell T. A., Turney L. J. Influence of alum on the firmness of fresh-pack dill pickles // *J. Food Sci.,* 1972, 37, p. 442–445.
15. Faubian J. M., Hoseny R. C. Lipoxygenase: Its biochemistry and role in breadmaking // *Cereal Chem.,* 1981, 58, p. 175–180.
16. *Food Chemicals Codex* / Food and Nutrition Board. — 3rd ed. — Washington, D.C.: National Research Council; National Academy Press, 1981. — 735 p.
17. USDA petitioned to remove titanium dioxide marker requirements for soy protein // Food Chemical News, 1983, March 21, p. 37–38.
18. Freese E., Levin B. E. Action mechanisms of preservatives and antiseptics // *Developments in Industrial Microbiology* / L. A. Underkofler (ed.). — Washington, D.C.: Society of Industrial Microbiology, 1978. — P. 207–227.
19. Furia T. E. Regulatory status of direct food additives // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 903–966.
20. Furia T. E. Sequestrants in food // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 271–294.

21. Furia T. E., Bellanca N. (eds). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients.* — 2 Vols. —Cleveland, OH: Chemical Rubber Co., 1976.
22. Gardner W. H. Acidulants in food processing // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — p. 225–270.
23. Goddard S. J., Wedzicha B. L. Kinetics of the reaction of sorbic acid with sulphite species // *Food Addit. Contam.,* 1992, 9, p. 485–492.
24. Griffin W. C., Lynch M. J. Polyhydric alcohols // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — 2nd ed. — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 431–455.
25. Griswold R. M. Leavening agents // *The Experimental Study of Foods* / R. M. Griswold (ed.). — Boston, MA: Houghton Mifflin Co., 1962. — P. 330–352.
26. Haddon W. F, Mancini M. L., McLaren M., Effio A., Harden L. A., Degre R. L., Bradford J. L. Occurrence of ethyl carbamate (Urethane) in U.S. and Canadian breads: Measurements by gas chromatography-mass spectrometry // *Cereal Chem.,* 1994, 71, p. 207–215.
27. Ham R. Interactions between phosphates and meat proteins // *Symposium: Phosphates in Food Processing* / J. M. DeMan, P. Melnychyn (eds). — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1971. — P. 65–84.
28. Heath H. B. *Source Book of Flavors.* — Westport, CT: AVI Publishing Co., 1981. — 861 p.
29. Ishii H., Koshimizu T. Toxicity of aspartame and its diketopiperazine for Wistar rats by dietary administration for 104 weeks // *Toxicology,* 1981, 21, p. 91–94.
30. Joslyn M. A. Gassing and deaeration in food processing // *Food Processing Operations: Their Management, Machines, Materials, and Methods* / M. A. Joslyn, J. L. Heid (eds). — Vol. 3. — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1964. — P. 335–368.
31. Kabara J. J., Varable R., Jie M. S. Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides // *Lipids,* 1977, 12, p. 753–759.
32. Karahadian C., Lindsay R. C. Evaluation of the mechanism of dilauryl thiodipropionate antioxidant activity // *J. Amer. Oil Chem. Soc.,* 1988, 65, p. 1159–1165.
33. Khandelwal G. D., Rimmer Y. L., Wedzicha B. L. Reaction of sorbic acid in wheat flour doughs // *Food Addit. Contam.,* 1992, 9, p. 493–497.
34. Klose R. E., Glicksman M. Gums // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 295–359.
35. Labuza T. P., Heidelbaugh N. D., Silver M., Karel M. Oxidation at intermediate moisture contents // *J. Amer. Oil Chem. Soc.,* 1971, 48, p. 86–90.
36. Lewis R. J., Sr. *Food Additives Handbook.* — NY: Van Nostrand Reinhold, 1989.
37. Lucca P. A., Tepper B. J. Fat replacers and the functionality of fat in foods // *Trends Food Sci. Technol.,* 1994, 5, p. 12–19.
38. Mahon J. H., Schlamb K., Brotsky E. General concepts applicable to the use of polyphosphates in red meat, poultry, seafood processing // *Symposium: Phosphates in Food Processing* / J. M. DeMan, P. Malnychyn (eds). — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1971. — P. 158–181.
39. Miller M. S. Proteins as fat substitutes //*Protein Functionality in Food Systems* / N. S. Hettiarachchy, G. R. Ziegler (eds). — NY: Marcel Dekker, 1994. —P. 435–465.
40. Miller W. T. The legacy of cyclamate // *Food Technol.,* 1987, 41(1), p. 116.
41. Minifie B. W. *Chocolate, Cocoa and Confectionery: Science and Technology.* — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1970. — P. 38–41. — [Имеется русский перевод 3-го изд. (1985 г.). См. Шоколад, конфеты, карамель и другие кондитерские изделия / Минифай Б. У.; пер. с англ. под общ. ред. Т. В. Савенковой. — СПб.: Профессия, 2008. — 816 с., ил.]
42. Peng S. K., Taylor C., Hill J. C., Marin R. J. Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage // *Arteriosclerosis,* 1985, 54, p. 121–136.
43. Pomeranz Y., Shallenberger J. A. *Bread Science and Technology.* — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1971.
44. Pratter P. J. Neohesperidin dihydrochalcone: An updated review on a naturally derived sweetener and flavor potentiator // *Perfumer Flavorist,* 1980, 5(6), p. 12–18.
45. Price J. M., Biana C. G., Oser B. L., Vogin E. E., Steinfeld J., Ley H. L. Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin // *Science,* 1970, 167, p. 1131–1132.
46. Ramarathnam N., Rubin L. J. The flavour of cured meat // *Flavor of Meat and Meat Products* / F. Shahidi (ed.). — London: Blackie Academic & Professional, 1994. — P. 174–198.
47. Salant A. Nonnutritive sweeteners // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — 2nd ed. —Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 523–586.
48. Scharpf L. G. The use of phosphates in cheese processing // *Symposium: Phosphates in Food Processing* / J. M. DeMan, P. Melnychyn (eds). — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1971. — P. 120–157.
49. Scott U. N., Taylor S. L. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores // *J. Food Sci.* 1981, 46, p. 117–126.
50. Sebranek J. G., Cassens R. G. Nitrosamines: A review // *J. Milk Food Technol.,* 1973, 36, p. 76–88.
51. Singleton V. L. Adsorption of natural phenols from beer and wine // *MBAA Tech. Q.,* 1967, 4(4), p. 245–253.

52. Smith R. E., Finley J. W., Leveille G. A. Overview of Salatrim, a family of low-calorie fats // *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, p. 432–434.
53. Stahl J. E., Ellinger R. H. The use of phosphates in the baking industry // *Symposium: Phosphates in Food Processing* / J. M. De-Man, P. Melnychyn (eds). — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1971. — P. 194–212.
54. Stauffer C. E. Dough conditioners // *Cereal Foods World,* 1983, 28, p. 729–730.
55. Stukey B. N. Antioxidants as food stabilizers // *Handbook of Food Additives* / T. E. Furia (ed.). — 2nd ed. —Cleveland, OH: CRC Press, 1972. — P. 185–224.
56. Thompson J. E., Buddemeyer B. D. Improvement in flour mixing characteristics by a steryl lactylic acid salt // *Cereal Chem.*, 1954, 31, p. 296–302.
57. van Buren J. P., Moyer J. C., Wilson D. E., Robinson W. B., Hand D. B. Influence of blanching conditions on sloughing, splitting, and firmness of canned snap beans // *Food Technol.*, 1960, 14, p. 233–236.
58. van der Wei H. Miracle fruit, katemfe, and serendipity berry // *Symposium: Sweeteners* / G. Inglett (ed.). — Westport, CO: AVI Publishing Co., 1974. — P. 194–215.
59. Weast R. C. (ed.) *Handbook of Chemistry and Physics.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. — P. D161–D163.
60. Wedzicha R. L. *Chemistry of Sulphur Dioxide in Foods.* — London: Elsevier Applied Science Publishers, 1984.
61. Wedzicha R. L. Chemistry of sulphiting agents in foods // *Food Additives Contam.*, 1992, 9, p. 449–459.
62. Wesley R., Rourke R., Darbishire O. The formation of persistent toxic chlorohydrins in foodstuffs by fumigation with ethylene oxide and with propylene oxide // *J. Food Sci.*, 1965, 30, p. 1037–1042.

12. БИОАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА. НУТРИЦЕВТИКИ И ТОКСИЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Чи-Тань Хо (*Chi-Tang Ho*), Мохамед М. Рафи (*Mohamed M. Rafi*), Гита Гаи (*Geetha Ghai*)
Перевод Т. О. Зверевич под науч. ред. акад. РАМН, проф. В. А. Тутельяна

Содержание

12.1. Нормативно-правовые основы 692
12.2. Научные аспекты использования биологически активных веществ. 693
12.3. Полезные для здоровья вещества растительного происхождения 694
12.3.1. Каротиноиды 694
12.3.2. Флавоноиды 696
12.3.3. Проантоцианидины 700
12.3.4. Прочие полифенольные соединения 701
12.3.5. Серосодержащие биоактивные вещества растений семейства луковых 702
12.3.6. Изотиоцианаты и индолы 703
12.4. Общие механизмы защитного действия соединений растительного происхождения 705
12.5. Биологически активные добавки к пище (БАД) растительного происхождения 706
12.6. Нутрицевтики, образующиеся при переработке пищевых продуктов 708
12.7. Биодоступность биологически активных соединений 709
12.8. Природные токсиканты растительного происхождения 710
12.9. Токсиканты пищевых продуктов, образующиеся при переработке 713
Литература 716

Биологически активные вещества подразделяют на нутрицевтики и токсичные вещества (токсиканты). Нутрицевтиками называют натуральные биологически активные соединения, благотворно влияющие на состояние здоровья человека — способствующие профилактике заболеваний и/или обладающие лечебными свойствами. Токсичными могут быть как натуральные соединения, так и полученные химическим путем — они негативно воздействуют на здоровье человека. В овощах и фруктах, в популярных напитках, в зернах, орехах, жирах и масла, в морепродуктах, в лекарственных растениях и продуктах из растительного сырья содержатся как нутрицевтики, так и токсиканты. Количество биоактивных веществ с разными фармакологическими свойствами зависит от их источника — если в нем больше нутрицевтиков, чем токсикантов, то данный источник потенциально способствует защите организма от заболеваний. Именно к этой категории относится большинство потребляемых человеком овощей и фруктов.

12.1. Нормативно-правовые основы

В настоящее время широкое распространение получило использование биоактивных веществ в нетрадиционной медицине и в производстве биологически активных добавок (БАД), причем даже несмотря на то что их эффективность и безопасность для здоровья научно еще не подтверждена. В 1994 г. Конгрессом США был принят Закон о биологически активных добавках к пище (*Dietary Supplement Health and Education Act, DSHEA*), в котором были смягчены требования к маркировке и этикетированию БАД, особенно по сравнению с требованиями к лекарственными препаратам и пищевым добавкам. Этот закон существенно ограничил возможности *FDA* США (Управления по контролю пищевых продуктов и лекарственных

препаратов, *Food and Drug Administration*) по правовому регулированию безопасности, чистоты и эффективности БАД. Нормативно-правовых актов *FDA* по нутрицевтикам, пищевым продуктам лечебного назначения и БАД практически нет, так что юридически они не являются ни пищевыми продуктами, ни лекарственными препаратами [23].

12.2. Научные аспекты использования биологически активных веществ

Долгое время во всем мире люди использовали растения и продукты из растительного сырья для лечения многих заболеваний — до сих пор около 80% населения Земли полагается при лечении болезней именно на препараты из растительного сырья. Биологическую активность того или иного натурального продукта зачастую объясняют сочетанным воздействием нескольких его компонентов, однако в большинстве случаев активный ингредиент не до конца изучен. В то же время примерно 15 млн американцев принимают лекарственные препараты на основе растительного сырья по назначению врача.

О пользе употребления в пищу большего количества овощей и фруктов стали говорить после наблюдений за состоянием здоровья населения, то есть по результатам так называемых «обсервационных эпидемиологических исследований». Научные исследования проблем здоровья, связанных с питанием, называют «эпидемиологией питания». Чаще всего в таких эпидемиологических исследованиях ищут связь между тем или иным заболеванием и одним или несколькими нутриентами или пищевыми продуктами. Методы эпидемиологии питания имеют определенные концептуальные и методологические ограничения, так как люди употребляют в пищу не нутриенты и пищевые продукты или определенные их сочетания по отдельности, а весьма разнообразные комбинации пищевых продуктов, включающие самые разные ингредиенты. В последние годы разработаны так называемые комплементарные методы, позволяющие в анализе рационов преодолеть определенные ограничения [27], и хотя результаты их применения весьма полезны, не следует забывать, что наиболее ценная информация была получена именно методами обсервационных эпидемиологических исследований (наблюдений). Примером может служить изучение роли витаминов в питании.

Эпидемиологические исследования питания показали, что факторы окружающей среды, особенно факторы питания, оказывают сильное предотвращающее (профилактическое) влияние на гормонзависимый канцерогенез, а недостаточное потребление фруктов и овощей связывают с высокой смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [53]. Одним из классов веществ, обладающих таким противораковым действием, являются соединения растительного происхождения и фитоэстрогены, присутствующие в большом количестве в соевых продуктах [38]. Во многих пищевых продуктах, пряностях и специях содержатся флавоноиды и фитоэстрогены, а также пока еще не идентифицированные соединения с эстрогенной активностью* у больных раком простаты. Хемопрофилактика путем потребления нутрицевтиков (например, ресвератрола из винограда, ликопина из томатов, генистеина из соевых продуктов) может снижать заболеваемость раком и смертность [38]. К пищевым продуктам и пряным травам с противораковым действием относят чеснок, соевые бобы, кочанную капусту, имбирь, солодку, репчатый лук, семена льна, куркуму, овощи семейства крестоцветных, томаты, перец, бурый рис, пшеницу, а также растения семейства зонтичных — морковь, сельдерей и петрушку. Сильное профилактическое действие натуральных пищевых продуктов и их отдельных компонентов было доказано в экспериментах на животных [38]. Изучение воздействия нутрицевтиков на пути апоптоза**, сигнальные пути*** и/или другие мишени раковой опухоли способствует разработке и совершенствованию новых антираковых препаратов.

Лабораторные исследования проводят с использованием хорошо изученных модельных систем как внутри, так и вне тестовых организмов. Исследования *in vitro* проводят в искусственной среде, воспроизво-

---

* Так называемые «эстрогенные» соединения имитируют действие эстрогена и аналогичных гормонов в организме человека, дополняют его или являются его антагонистами. — *Примеч. авт.*

** Апоптоз — это запрограммированная смерть клетки, естественное свойство ее жизненного цикла, биологическая смена роста и развития. Некроз — это гибель клетки вследствие ее повреждения. — *Примеч. авт.*

*** Цепь биохимических событий, обусловливающих отклик клетки на некоторый стимул. — *Примеч. авт.*

дящей условия внутри организма. Для этих исследований используют выделенные ферменты, клеточные культуры, ткани и органы. В исследованиях *in vivo* обычно изучают физиологические или патологические реакции объекта на внешние воздействия. Разработаны модели для различных стадий заболеваний, а биологический материал закупается у специализированных поставщиков или получают лабораторно. В целях моделирования применяют самые разные методы — например, модели разрабатывают с помощью химических веществ или путем скрещивания или селекции. За последние десять лет с помощью генной инженерии разработано множество моделей на мышах (так называемых мышах*). В исследованиях на этих моделях ученые пытаются понять, как проходит течение болезни и как ее лечить. В настоящее время для поиска путей профилактики хронических заболеваний используют и *in vitro*, и *in vivo* методы. Несмотря на определенные ограничения, неизбежные для лабораторных условий, долгосрочные исследования зачастую дают весьма важные научные результаты, которые используются при изучении человеческого организма или при эпидемиологических исследованиях.

12.3. Полезные для здоровья вещества растительного происхождения

Вещества, содержащиеся в овощах и фруктах и оказывающие благотворное влияние на здоровье, можно разделить на несколько групп.

12.3.1. Каротиноиды

Каротиноиды — это натуральные жирорастворимые красящие вещества, придающие растениям и животным яркую окраску. Они обладают антиоксидантными свойствами, а некоторые из них обладают активностью провитамина А. Определящей характеристикой каротиноидов является химическая структура каркаса их молекулы — полиеновая цепь из 40 атомов углерода с изопреноидными остатками. Структура этого полиенового каркаса с сопряженными двойными связями позволяет каротиноидам отбирать лишнюю энергию у других молекул с помощью механизма энергопереноса без участия излучения [45]. Вполне возможно, именно эта способность отвечает за антиоксидантные свойства каротиноидов биологического происхождения с соответствующим связыванием синглетного кислорода. Помимо поглощения реакционно-способного кислорода и свободных радикалов, у каротиноидов существуют и другие полезные для здоровья свойства, в частности поддержание иммунитета, защита от солнечных ожогов и замедление развития определенных онкологических заболеваний [6].

Каротиноиды чувствительны к воздействию света, воздуха, избыточной теплоты и кислот, что делает их уязвимыми при переработке и хранении пищевых продуктов и требует определенных мер по минимизации потерь каротиноидов.

Чаще всего в пищевых продуктах встречается бета-каротин (β-каротин, рис. 12.1), обладающий наиболее сильной из всех каротиноидов активностью провитамина А. Он способствует укреплению иммунной системы, усилению активности и изменению численности иммунных клеток, а также снижению риска онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, возрастной дегенерации макулы (желтого пятна) и катаракты [35]. Бета-каротин содержится в красном пальмовом масле, плодах масличной пальмы, листовых овощах, моркови, батате, спелых кабачках, в тыкве, манго и папайе.

Данные эпидемиологических исследований и лабораторных опытов на животных подтверждают гипотезу, согласно которой β-каротин способствует профилактике онкологических заболеваний [68], тогда как исследования его хемопревентивных свойств показали, что β-каротин по отдельности или в сочетании с витаминами А или Е повышает риск рака легких у представителей группы риска [44, 47]. Результаты других исследования *in vitro* и *in vivo* также свидетельствуют, что собственно β-каротин, возможно, и обладает противораковыми свойствами, но продукты его окисления могут усиливать канцерогенез, что может объяснить данные хемопревентивных исследований. Другими словами, нестабильность молекулы β-каротина в среде с высоким содержанием свободных радикалов (например, в легких курильщиков) может привести к образованию канцерогенных продуктов окисления каротина [68].

* У «нокаутных мышей» методами генной инженерии «выключен» один или несколько генов. — *Примеч. авт.*

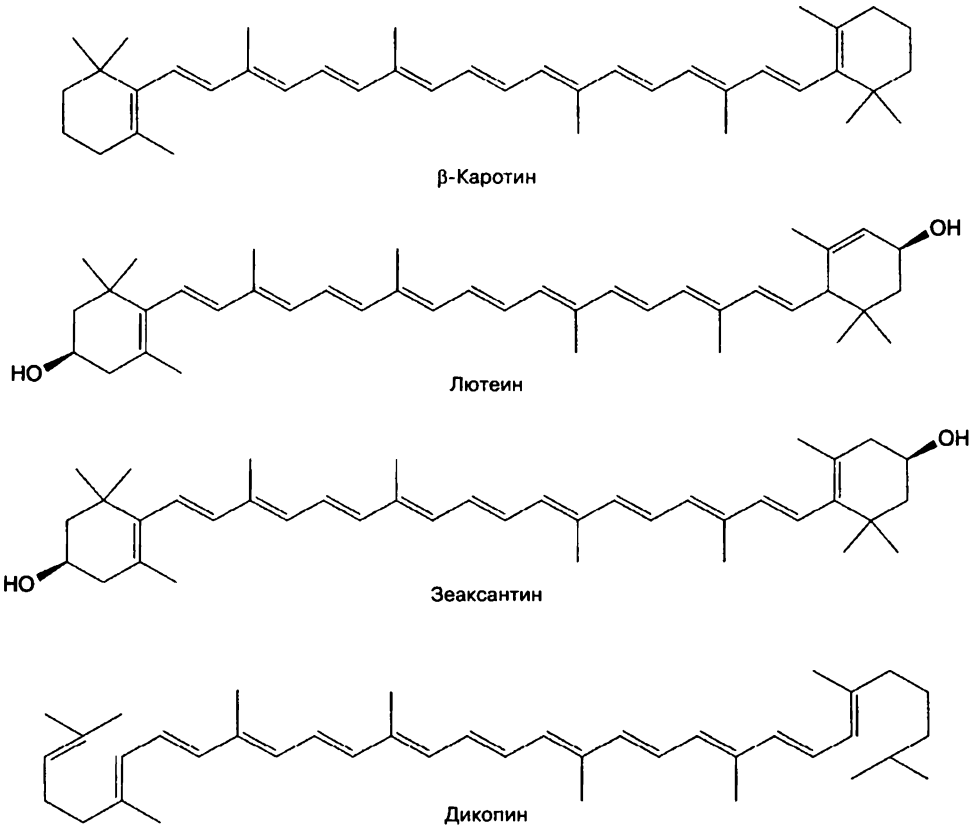


Рис. 12.1. Структурные формулы β-каротина, лютеина, зеаксантина и ликопина

Считается также, что β-каротин обладает антиоксидантным действием. Он способен связывать свободные радикалы лишь при таком парциальном давлении кислорода, которое ниже чем у обычного воздуха [7]. Подобное пониженное парциальное давление кислорода характерно для большинства тканей в нормальных физиологических условиях. При повышенном парциальном давлении кислорода β-каротин теряет свои антиоксидантные свойства и действует как прооксидант [7]. Эти исследования с очевидностью показали необходимость изучения химии отдельных нутрицевтиков. Если при изучении биологических свойств не учитывать молекулярных свойств (например, β-каротина), то мы постоянно будем сталкиваться с теми же противоречиями, что еще более осложнит понимание функциональности биоактивных веществ.

Лютеин и его изомер зеаксантин — это желтые пигменты, относящиеся к классу каротиноидов, не обладающих активностью провитамина А (см. рис. 12.1). В отличие от других каротиноидов у них на концевых кольцах сопряженных двойных связей присутствуют гидроксильные группы, и поэтому их называют оксикаротиноидами или ксантофиллами. В природе лютеин содержится главным образом в темно-зеленых листовых овощах (например, в шпинате и кормовой капусте), а зеаксантин придает желтую окраску кукурузе. К другим источникам этих соединений относятся кабачки, тыква, груши, кочанная капуста, перец, апельсины, киви и виноград. Вместе с тем до сих пор нет достаточных доказательств того, что лютеин и зеаксантин полезны для здоровья и замедляют возрастную дегенерацию макулы и (в меньшей степени) развитие онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [10]. Доказательства важности лютеина и зеаксантина для здоровья глаз кажутся наиболее достоверными прежде всего благодаря тому, что в большинстве эпидемиологических исследований этой проблемы использовались в основном ткани глаза. При сильной концентрации в макуле (области наибольшей остроты зрения) лютеин и зеаксантин способны

отфильтровывать вредную синюю область спектра видимого света и одновременно выступают в качестве антиоксидантов, связывая потенциально нежелательные реакционно-способные формы кислорода [60].

Ликопин (см. рис. 12.1) — это каротиноид, присутствующий в томатах, дынях, папайе, абрикосах, грейпфрутах и обладающий антиоксидантным и антиканцерогенным действием. Около 80% ликопина всех пищевых продуктов приходится на долю томатов и продуктов на их основе. Вторым по значимости источником ликопина являются дыни. Биологическая доступность ликопина довольно невелика, но при тепловой обработке она увеличивается [61]. Данные многочисленных исследований позволяют предположить, что потребление томатных продуктов, прошедших тепловую обработку, снижает риск рака простаты. Употребление в пищу переработанных томатных продуктов связывают также со снижением риска других онкологических и сердечнососудистых заболеваний. Несмотря на то что эти полезные свойства ликопина относят на счет его антиоксидантных свойств, появляется все больше доказательств, что в этом случае действуют и другие механизмы, в том числе гормональные и иммунные [54]. Ликопин по сравнению с другими каротиноидами (например, β-каротином или лютеином) в наибольших количествах присутствует в плазме крови человека. В сыворотке крови ликопин обычно связан с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) и переносится в различные органы — в печень, надпочечники, семенники и предстательную железу [54]. Кроме того, ликопин в организме человека является преобладающим каротиноидом, и наиболее высокое его содержание регистрируется именно в семенниках, надпочечной и предстательной железах, а также в печени.

12.3.2. Флавоноиды

Флавоноиды присутствуют во всех растениях и практически все ткани растений способны их синтезировать. Флавоноиды насчитывают не менее 2000 природных разновидностей и присутствуют в плодах, листовых овощах, корнях, клубнеплодах, луковицах, пряных травах, специях, бобах, в чае, кофе и красном вине. Все флавоноиды можно разделить на семь групп: флавоны, флаваноны, флавонолы, флаванонолы, изофлавоны, флаванолы (катехины) и антоцианидины (рис. 12.2). Примеры наиболее распространенных флавоноидов, содержащихся в пищевых продуктах, приведены в табл. 12.1. Как правило, в листьях, цветах, плодах и в растения в целом содержатся гликозиды флавоноидов, в древесных тканях — их агликоны, а в семенах — и то и другое.

Таблица 12.1
Классы флавоноидов, расположение их заместителей и пищевые источники

Класс	Название	Заместители	Природный источник
Флавон	Апигенин	5,7-OH	Петрушка, сельдерей
	Рутин	5,7,3',4'-OH, 3-O-рутиноза	Гречиха, цитрусовые
	Тангеретин	4,5,6,7,4'-OCH_3	Цитрусовые
Флаванон	Нарингин	5,4'-OH	Цитрусовые
	Нарингенин	5,7,4'-OH	Кожура апельсина
Флаванол	Кемпферол	3,5,7,4'-OH	Брокколи, чай
	Кверцетин	3,5,7,3',4'-OH	Лук, брокколи, яблоки, ягоды
Флаванонол	Таксифолин	3,5,7,3',4'-OH	Фрукты
Изофлавон	Генистеин	5,7,4'-OH	Соевые бобы
	Даидзеин	4'-OH, 7-O-глюкоза	Соевые бобы
	Пуэрарин	7,4'-OH, 8-C-глюкоза	Кудзу
Флаванол (катехин)	(–)-Эпикатехин	3,5,7,3',4'-OH	Чай
	(–)-Эпигаллокатехин	3,5,7,3',4' ,5'-OH	Чай
	(–)-Эпигаллокатехингаллат	5,7,3',4',5'-OH, 3-галлат	Чай
Антоцианидин	Цианидин	3,5,7,3',4'-OH	Вишня, земляника
	Дельфинидин	3,5,7,3',4',5'-OH	Темные фрукты

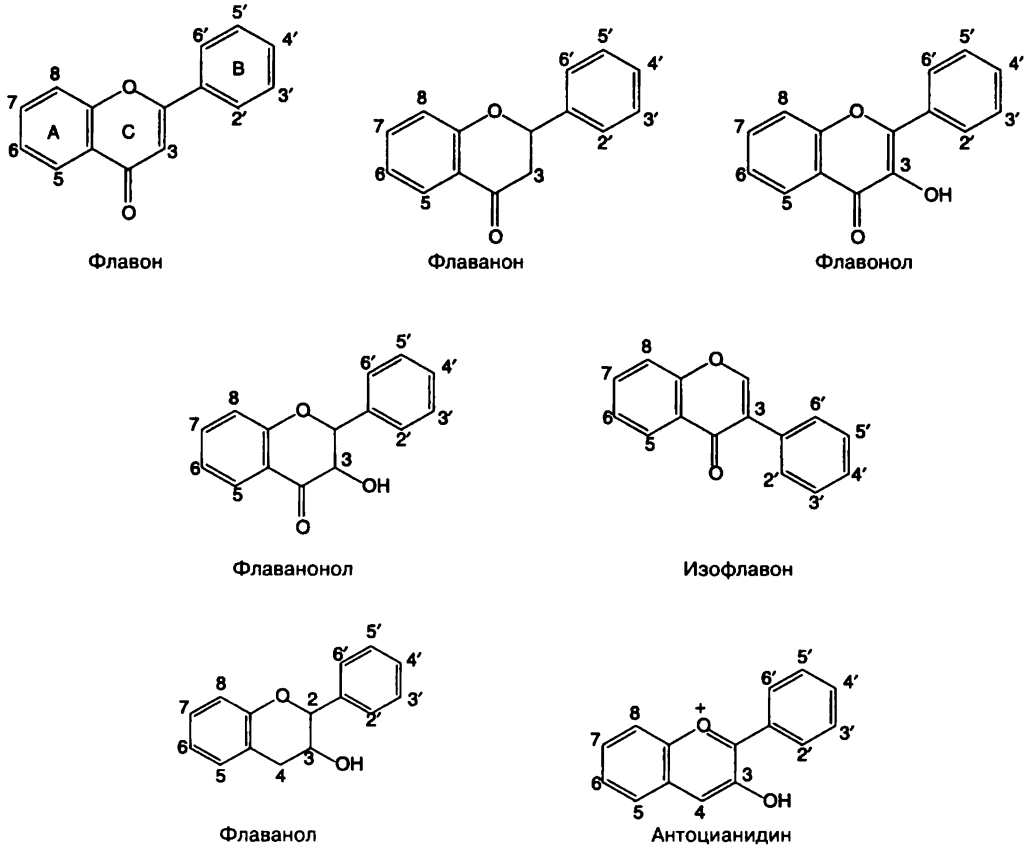


Рис. 12.2. Структурные формулы флавоноидов

Из-за такой своей распространенности флавоноиды составляют неотъемлемую часть рациона человека. В среднем ежедневное потребление флавоноидов жителями США составляет почти 1 г на человека [28], но если сравнить эти оценки с результатами исследования лиц пожилого возраста (*Zutphen Elderly Study*, [24]), то они могут показаться преувеличенными [24]. В ходе этой работы измерялось содержание отдельных флавоноидов (кверцетина, кемпферола, мирицетина, апигенина и лютеолина) в различных пищевых продуктах, популярных в Нидерландах. В результате оценки потребления флавоноидов 805 мужчинами в возрасте 65–84 лет было показано, что среднее потребление составляет 25,9 мг/сут. Более точные данные относительно потребления различных групп флавоноидов были получены в ходе последующих исследований [37] — например, потребление флавонолов жителями США составляет около 20–25 мг/сут.

Практически всем флавоноидам присущи общие биологические и химические свойства [28]:

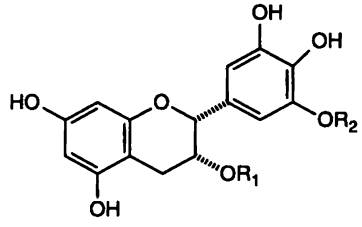
- антиоксидантное действие;
- способность связывать активные формы кислорода;
- способность связывать электрофилы;
- способность ингибировать нитрозирование;
- способность образовывать хелатные комплексы с металлами (железом и медью);
- образовывание в присутствии некоторых металлов перекись водорода;
- способность модулировать активность некоторых клеточных ферментов.

Считается, что рацион, богатый флавоноидами, способствует защите организма от сердечно-сосудистых и некоторых видов онкологических заболеваний, а также от нейродегенеративных расстройств.

К полезным для здоровья и наиболее изученным за последние годы флавоноидам относятся катехины зеленого чая. Чай — один из наиболее потребляемых в мире напитков, и в Китае и Японии его уже ты-

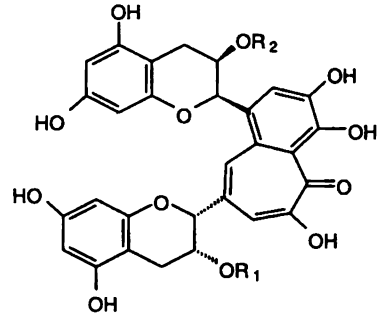
сячи лет используют в медицинских целях. Из листьев растения *Camellia sinensis* при помощи различных технологий получают более 300 различных сортов чая. Обычно различают три его типа: зеленый (неферментированный), оолонг (полуферментированный) и черный (ферментированный). Зеленый чай и чай оолонг наиболее популярны в Китае, Японии, Корее и некоторых африканских странах, тогда как в Индии и западных странах предпочитают черный чай. Экспериментальные и эпидемиологические исследования позволили установить связь между потреблением чая и снижением риска сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, которую приписывают действию его полифенольных компонентов [55]. Катехины — это полифенолы, в наибольших количествах присутствующие в зеленом чае. Обычно в чашке заваренного зеленого чая содержится 30–40% катехинов (по СВ), в том числе эпигаллокатехин-3-галлат (*EGCG*), эпигаллокатехин (*EGC*), эпикатехин-3-галлат (*ECG*) и эпикатехин (*EC*) (рис. 12.3). Больше всего *EGCG* в зеленом, черном чае и чае оолонг. В стакане (237 мл) зеленого чая и чая оолонг обычно содержится 30–130 мг *EGCG*, а черного чая — не более 70 мг *EGCG* [55]. Основными красящими веществами черного чая являются теафлавины и теарубигины, являющиеся продуктами окисления и полимеризации катехинов в процессе ферментации. В ферментированном черном чае содержится 3–10% катехинов, 2–6% теафлавинов и более 20% теарубигинов. Структура четырех основных теафлавинов показана на рис. 12.4, а структура теарубигинов изучена еще недостаточно [55]. Известно, что теафлавины обусловливают такие свойства черного чая, как цвет, вкус и «ощущение во рту» [55]. Зеленый чай и его компоненты хорошо изучены как *in vitro*, так и на моделях канцерогенеза на животных [71]. Если на моделях в некоторых случаях доказывается эффективность действия этих компонентов, то эпидемиологические свидетельства эффективности потребления чая для снижения инцидентости онкологических заболеваний человека довольно противоречивы [71]. В связи с данными исследований на линиях раковых клеток рассматривались различные возможные механизмы профилактического действия чая и его компонентов. В исследованиях *in vitro* полифенолы чая (особенно *EGCG*) были способны ингибировать рост и запускать апоптоз ряда линий опухолевых клеток человека, включая раковые клетки меланомы, молочной железы, легких, крови и толстой кишки [55, 71], роль этих механизмов *in vivo* однако еще предстоит доказать. Одной из проблем исследований *in vitro* является то, что используются сравнительно высокие концентрации компонентов чая, намного превосходящие их содержание в плазме крови и тканях животных после употребления чая.

Согласно данным исследований по биодоступности зеленого чая и катехинов оказалось, что при пероральном получении 20 мг СВ зеленого чая/кг массы тела максимальное содержание в плазме крови *EGC*, *EC* и *EGCG* составляет соответственно 728,8, 427,6, и 170,1 нМ. В плазме крови эпикатехин и эпигаллокатехин присутствуют преимущественно в форме глюкуронида или конъюгатов сульфата, тогда как 77% эпигаллокатехингаллата присутствует в несвязанном виде [70].



Общепринятое название	Сокращение	R_1	R_2
Эпикатехин	EC	H	H
Эпикатехин галлат	ECG	Галлат	H
Эпигаллокатехин	EGC	H	Галлат
Эпигаллокатехин галлат	EGCG	Галлат	Галлат

Рис. 12.3. Структурная формула основных катехинов зеленого чая



Общепринятое название	Сокращение	R_1	R_2
Теафлавин	TF	H	H
Теафлавин-3-галлат	TF3G	Галлат	H
Теафлавин-3'-галлат	TF3'G	H	Галлат
Теафлавин-3,3'-галлат	TFDG	Галлат	Галлат

Рис. 12.4. Структурная формула теафлавинов черного чая

Другим распространенным флавоноидом является кверцетин (рис. 12.5), который содержится в винограде, вине, чае, репчатом луке, яблоках и листовых зеленых овощах. Он является мощным антиоксидантом и обладает противовоспалительными свойствами, защищая кровеносные сосуды, клетки и клеточные структуры от вредного воздействия свободных радикалов. Как антиоксидант кверцетин снижает содержание ЛПНП-холестерина и способствует профилактике сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Механизм противовоспалительного действия кверцетина связан с ингибированием активности липоксигеназы и циклооксигеназы, что приводит к снижению образования оксилипиновых производных, служащих медиаторами воспалительных процессов [18].

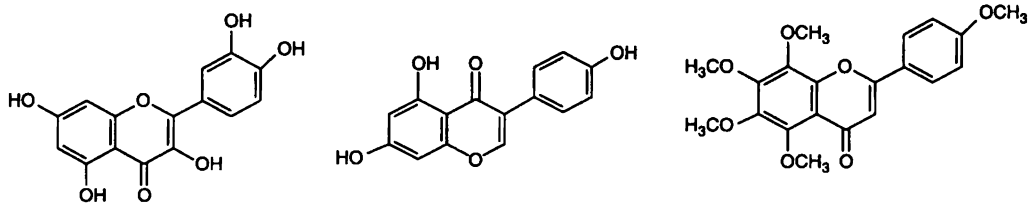


Рис. 12.5. Структурные формулы кверцетина, генистеина и тангеретина

В последние годы признана полезность для здоровья сои и продуктов на ее основе, отновным нутрицевтиком которых является изофлавон генистеин (рис. 12.5). Будучи фитоэстрогеном, генистеин не проявляет эстрогенного действия — наоборот, он обладает антиэстрогенным действием. Структура фитоэстрогенов напоминает структуру эстрогенных стероидов, что объясняет их антагонизм. Судя по всему, на продуцирование специфичных внутриклеточных белков влияет конкурентное связывание фитоэстрогенов с эстрогеновыми рецепторами в ядре клетки; эти белки проникают в ядра клеток, связываются с регуляторным участком ДНК и влияют на образование белков путем повышения или снижения экспрессии генов [17].

Генистеин, как было показано в результате исследований *in vitro*, ингибирует рост различных типов раковых клеток, особенно гормонозависимых. К механизмам его действия относятся ингибирование активности ферментов, участвующих в росте и развитии новообразований, а также запуск процессов апоптоза [13]. Существуют также свидетельства антиоксидантных свойств генистеина, а также связывания им перекиси водорода.

Тангеретин (5,6,7,8,4'-пентаметоксифлавон, рис. 12.5) относится к полиметоксилированным флавонам. Особенно им богата кожура цитрусовых [46]. Тангеретин играет важную роль на всех стадиях развития рака, блокируя инициацию рака ксенобиотиками путем модулирования ферментов печени первой и второй фазы*, а также может различными путями блокировать стадию промоции канцерогенеза** Тангеретин также модулирует регуляцию клеточного цикла*** [46]. По сравнению с гидроксилированными флавоноидами, метоксилирование усиливает гидрофобность молекул, что повышает проницаемость клеточной мембраны и биодоступность *in vivo*. Кроме того, в отличие от гидроксилированных флавоноидов тангеретин примерно в тех же концентрациях не обладает генотоксичностью (по результатам теста Эймса) [46]. Благодаря этим свойствам тангеретин и другие родственные ему полиметоксилированные флавоны, судя по всему, действительно снижают риск развития у человека онкологических и других хронических заболеваний.

---

* Ферменты, участвующие в метаболизме лекарств и (про)канцерогенов с последовательными стадиями гидроксилирования (I фаза) и конъюгации (II фаза). — *Примеч. авт.*

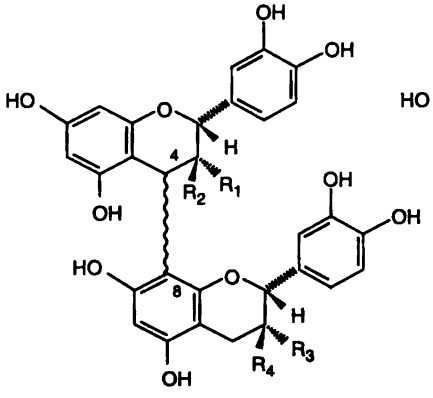
** Начальная стадия канцерогенеза характеризуется тем, что раковые клетки уже присутствуют, но для начала их неопластического роста требуется химический сигнал (промотор). — *Примеч. авт.*

*** Клеточный цикл — это последовательность событий, которую клетка проходит вплоть до деления; этот цикл регулируется особыми химическими веществами (циклинами), а также активностью ферментов. — *Примеч. авт.*

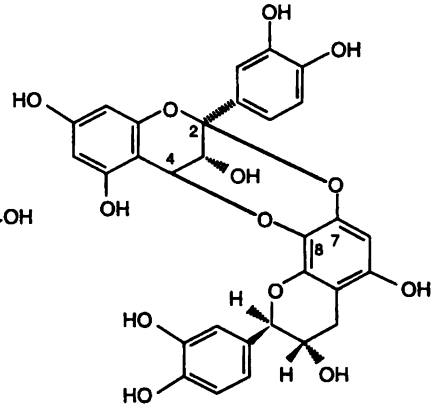
12.3.3. Проантоцианидины

Проантоцианидами называют конденсированные таннины, содержащиеся во фруктах, ягодах, в фасоли, орехах, какао и вине [50]. Высокое содержание проантоцианидов в растениях делает их важнейшей частью рациона человека [50]. Проантоцианиды представляют собой олигомеры или полимеры флаван-3-олов, связанные обычно связью $C_4 \rightarrow C_8$. Этот вид связи называют связыванием B-типа, а дополнительную эфирную связь $C_2 \rightarrow C_7$, обеспечивающую двойную связь звеньев флаван-3-олов, называют связыванием A-типа [50]. Химическая структура наиболее распространенных димеров B1, B2 и A2, а также тримеров C1 и C2 приведена на рис. 12.6.

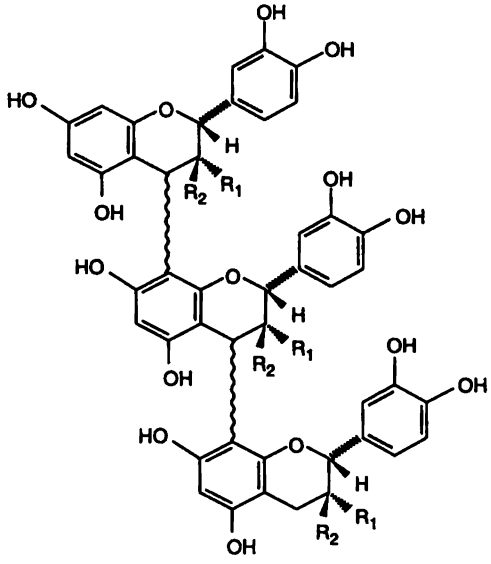
Тот факт, что французы реже болеют сердечно-сосудистыми заболеваниями, чем население других западных стран, даже невзирая на более высокое потребление жиров, связывают именно с употреблением красного вина. Этот так называемый «французский парадокс» объясняется именно высоким содержани-



B1: R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H; R_4 = OH
B2: R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = OH; R_4 = H



Димер A_2



C1: R_1 = OH; R_2 = H
C2: R_1 = H; R_2 = OH

Рис 12.6. Структура типичных димеров и тримеров проантоцианидина

ем проантоцианидинов в красном вине. Профилактическое действие проантоцианидинов относительно сердечно-сосудистых заболеваний было выявлено во многих исследованиях (как *in vitro*, так и *in vivo*) [50], однако данных о биодоступности и биотрансформации проантоцианидинов в организме человека довольно мало. Полученные результаты свидетельствуют, что проантоцианидины усваиваются плохо, причем большинство полимерных проантоцианидинов в тонком кишечнике не претерпевают никаких изменений, разлагаясь под воздействием микробиоты в толстом кишечнике с образованием малых фенольных кислот [50]. Вместе с тем существуют свидетельства того, что проантоцианидины клюквы эффективно предотвращают инфекции мочевыводящих путей.

12.3.4. Прочие полифенольные соединения

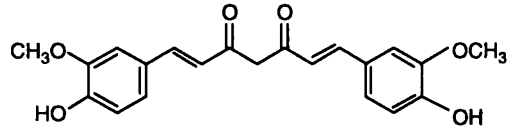
Помимо флавоноидов в пищевых продуктах присутствует много других полифенольных соединений, особенно в овощах, фруктах и специях. Некоторые данные об их влиянии на здоровье человека приведены в табл. 12.2.

Таблица 12.2
Прочие полифенолы, их пищевые источники и потенциальная польза для здоровья человека

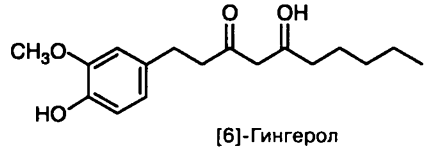
Полифенольное соединение	Пищевой источник	Эффект
Куркумин	Корень куркумы	Антиканцерогенный, противовоспалительный, кардиозащитный, противодиабетический
Гингерол	Корень имбиря	Антиканцерогенный, противорвотный
Карнозовая кислота, карнозол	Розмарин, шалфей	Антиоксидантный, антиканцерогенный
Ресвератрол	Виноград, красное вино	Антиканцерогенный, антиоксидантный, кардиозащитный

Высушенные корни куркумы (*Curcuma longa Linn*) веками использовались в качестве народного натурального лекарственного сырья для лечения местных воспалений и других болезней. Основной пигмент измельченного в порошок корня куркумы, которую также называют желтым имбирем, получил название куркумина (рис. 12.7). Куркума является также распространенной и популярной в Индии специей, используемой как консервант и пищевой краситель для увеличения срока хранения и подкрашивания пищевых продуктов и лекарственных средств. Данные разных исследований свидетельствуют, что куркумин и/или куркума обладают мощным противовоспалительным действием [1]. Помимо антиоксидантных и противовоспалительных свойств куркумин обладает также некоторыми антиканцерогенными свойствами, обусловленными снижением пролиферации раковых клеток и в результате инициации процесса апоптоза. Некоторые исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что куркумин очень эффективно индуцирует апаптоз некоторых видов раковых клеток [1]. Куркумин характеризуется малой биодоступностью, но результаты некоторых исследований его биотрансформации свидетельствуют, что в крови он присутствует в виде глюкуронида и/или сульфата [30].

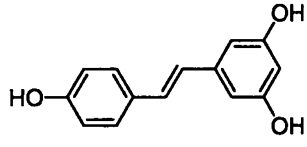
Гингеролы — это основные красящие вещества корня имбиря (*Zingiber officinale*), относящегося к семейству имбирных (*Zingiberaceae*). Имбирь обыкновенный тысячелетиями используется в качестве народного лекарственного средства. Наиболее изучены антикацерогенные свойства [6]-гингерола (рис. 12.7), который зарекомендовал себя мощным хемопротектором как *in vitro*, так *in vivo* [63]. Основным метаболитом [6]-гингерола является [6]-гингерол-4'-О-β-глюкуронид. В экспериментах на крысах было показано, что [6]-гингерол быстро выводится из плазмы крови (период его полувыведения составляет около 7 мин) [19].



Куркумин



[6]-Гингерол



Ресвератрол

Рис. 12.7. Структурные формулы куркумина, [6]-гингерола и ресвератрола

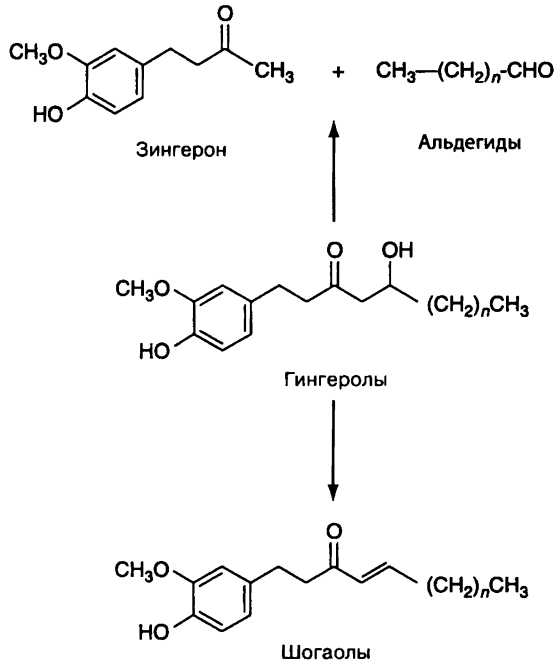


Рис. 12.8. Реакция расщепления гингеролов

Гингеролы чувствительны к нагреванию — при сушке и тепловой обработке продуктов гингеролы либо дегидратируются до соответствующих шогаолов или разлагаются в ходе альдольных реакций ретроградации до зингерона (его называют также цингероном) и соответствующих альдегидов (рис. 12.8) [9]. Биоактивность шогаолов до конца еще не изучена.

Ресвератрол (*транс*-3,5,4'-тригидроксистилбен, см. рис. 12.7) содержится преимущественно в кожице винограда, арахисе, шелковице и, самое главное, в красном вине. Он синтезируется из *p*-кумароил-CoA и малонил-CoA в ответ на стрессы, повреждения, инфицирование или облучение ультрафиолетом. Ресвератрол относится к фитоалексинам, обусловливающим стойкость растений к болезням. Относительно недавно в результате исследований *in vitro* и экспериментов на животных были получены подтверждения того, что ресвератрол обладает атеросклеротическим действием, антиоксидантной активностью, ингибирует агрегацию тромбоцитов и обладает антимутагенными и антиканцерогенными свойствами [31, 69].

Розмарин и листья шалфея широко используются как специи и вкусовые вещества. Сухие листья розмарина — одна из наиболее распространенных специй, применяемая при кулинарной обработке, поскольку она придает пище особый вкус и обладает высокими антиоксидантными свойствами. Из розмарина и листьев шалфея выделены несколько фенольных дитерпенов с антиоксидантными свойствами, в частности карнозовая кислота. Помимо антиоксидантных свойств и экстракт розмарина, и карнозовая кислота обладают способностью ингибировать у животных химически индуцированную инициацию опухолевых процессов*.

Карнозовая кислота при хранении и переработке нестабильна — сначала она окисляется с образованием карнозола, а при продолжении процесса окисления — розманола (механизм расщепления карнозовой кислоты показан на рис. 12.9) [25]. И карназол, и розманол обладают антиоксидантными свойствами, сравнимыми со свойствами карнозовой кислоты [25].

12.3.5. Серосодержащие биоактивные вещества растений семейства луковых

Еще одна группа фитонутрицевтиков — это сульфиды овощей рода луковых (*Allium*), а именно репчатого лука, чеснока, зеленого лука, шнитт-лука и лука-порея, обладающие многими полезными для человека свойствами. Они ингибируют рост и пролиферацию клеток, усиливают иммунную систему, изменяют процесс активации канцерогенов (ферментами первой фазы), стимулируют активность детоксицирующих ферментов (первой и особенно второй фазы), а также ингибируют связывание канцерогенов с ДНК [39]. Особенно сильной способностью сдерживать развитие рака кожи, желудка, мочевого пузыря и толстой кишки обладает чеснок, который обеспечивает также защиту от окислительных повреждений [65].

Основным органическим серосодержащим соединением свежеизмельченного чеснока является аллицин (диаллилтиосульфинат), и именно он благотворно влияет на здоровье человека, однако в неповрежденных тканях чеснока аллицина нет, поскольку аллиин (S-аллилцистеин-S-оксид, рис. 12.10) под действием фермента аллииназы превращается в аллицин (см. главы 6 и 10) только при резке или измельчении. Регулярное употребление в пищу чеснока снижает риск инфаркта и инсульта за счет снижения уровня

* Инициация опухолевых процессов происходит при преодолении порогового уровня мутаций, в результате чего запускается неоплазия — патологический неконтролируемый рост новых тканей. — *Примеч. авт.*

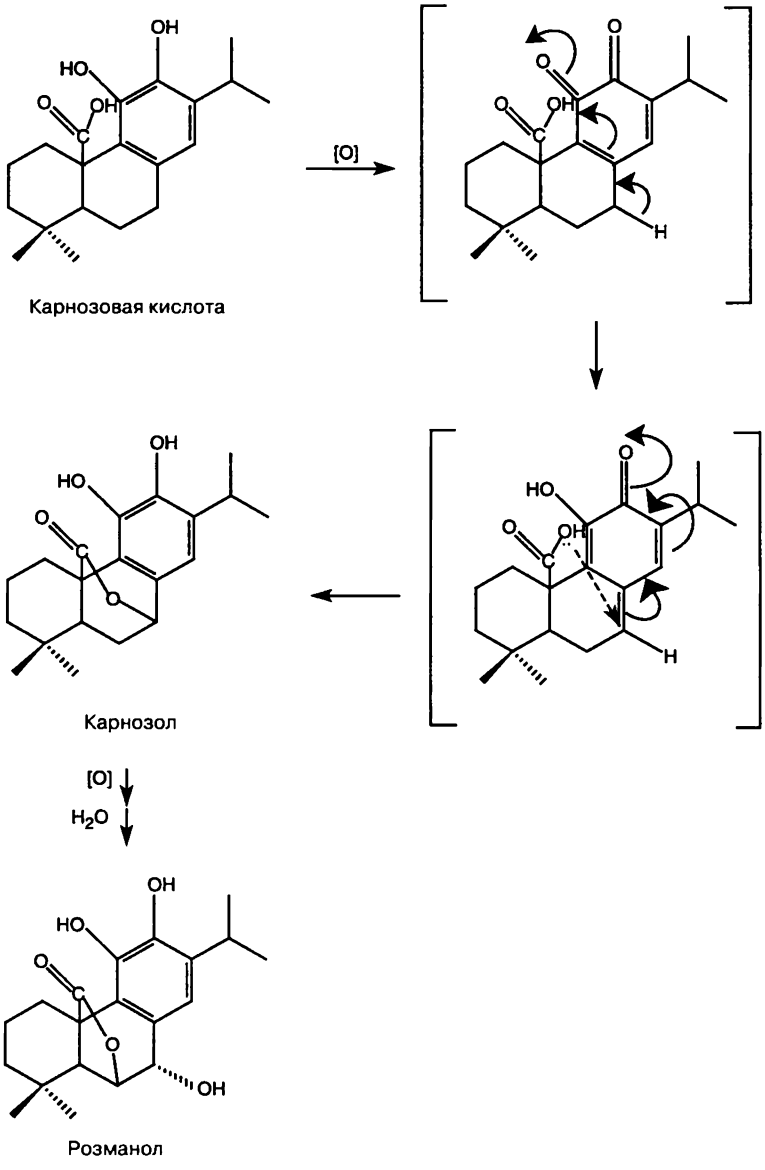


Рис. 12.9. Окисление карнозовой кислоты до карнозола и розманола

общего и ЛПНП-холестерина в крови, а также триглицеридов, не влияя при этом на уровень ЛПВП [51]. При химических превращения аллицина при нагревании образуются и другие серосодержщие соединения (рис. 12.10) — аджоены, винилдитиин и аллилметилтрисульфид, усиливающие фибринолитическую активность и ингибирующие агрегацию тромбоцитов [51]. Кроме того, эти серосодержащие соединения могут обладать и противоопухолевыми свойствами [51].

12.3.6. Изотиоцианаты и индолы

Изотиоцианаты и индолы образуются при пережевывании или измельчении некоторых овощей семейства крестоцветных — при этом под действием тиоглюкозидазы (мирозиназы) происходит гидролиз их конъюгированных предшественников — глюкозинолятов. Основным источником глюкозинолатов и продуктов их расщепления (см. главу 6) являются овощи рода капустных (*Brassica*) — кочанная капуста, брокколи,

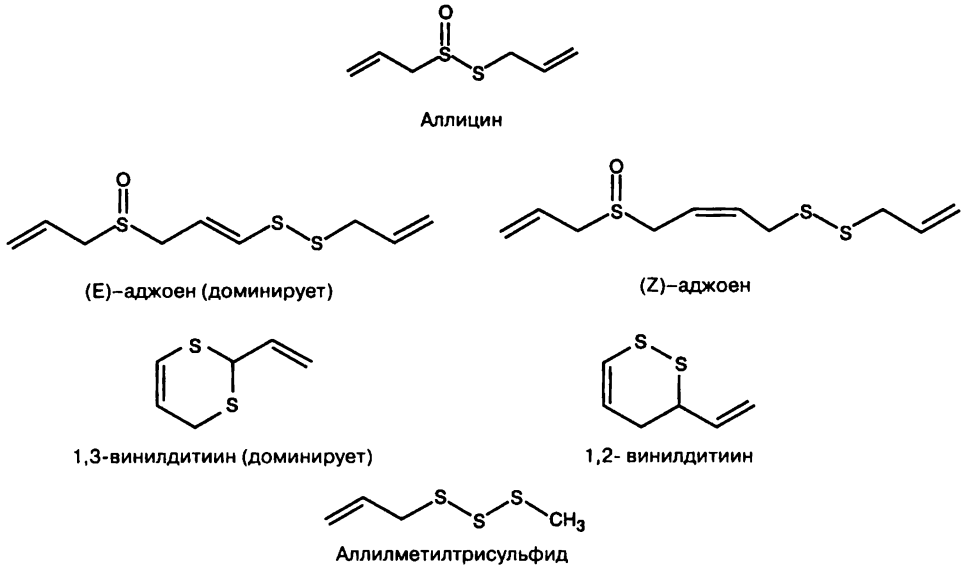


Рис. 12.10. Структурные формулы аллицина, аджоена, винилдитиина и аллилметилтрисульфида

кормовая капуста, турнепс, цветная и брюссельская капуста. У животных, получавших такие изотиоцианаты, как фенетил-, бензил- и 4-метилсульфинилбутилизотиоцианат (сульфорафан) (рис. 12.11), при воздействии канцерогенных веществ снижалась частота новообразований [11].

Изотиоцианаты термолабильны и при переработке пищевых продуктов, и основными продуктами их расщепления являются производные тиомочевины. Процесс разложения сульфорафана показан на рис. 12.12 — он сначала гидролизуется до амина, который вступает в реакцию с сульфорафаном с образованием N,N'–ди(метилсульфинил)бутилтиомочевины [33]. Влияние этой реакции на биоактивность еще требует своего изучения.

Индол-3-карбинол — это биоактивное соединение, образующееся из глюкобрассицина, содержащегося в овощах семейства крестоцветных, при гидролизе с помощью фермента мирозиназы, который высвобождается из растительной клетки в процессе пережевывания или измельчения (рис. 12.13). Индол-3-карбинол обладает антиканцерогенными и кардио-

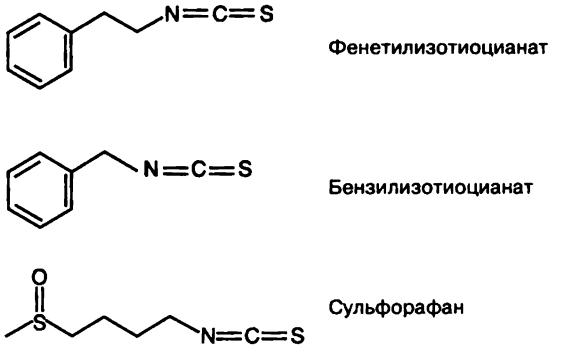


Рис. 12.11. Структурные формулы фенетил- и бензилизотиоцианата, а также сульфорафана

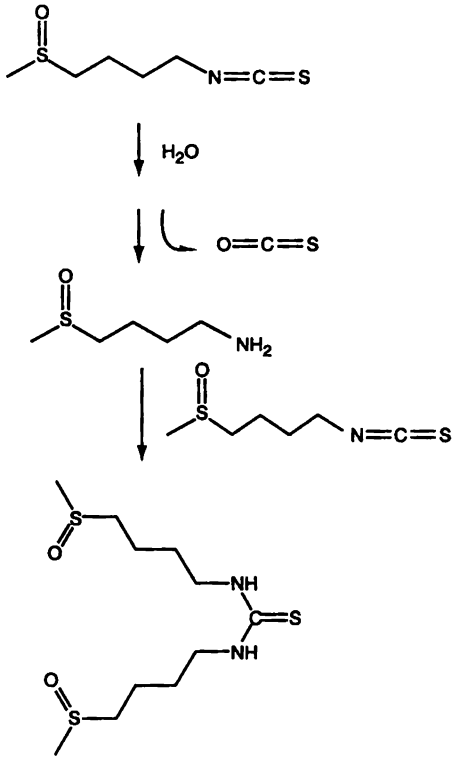
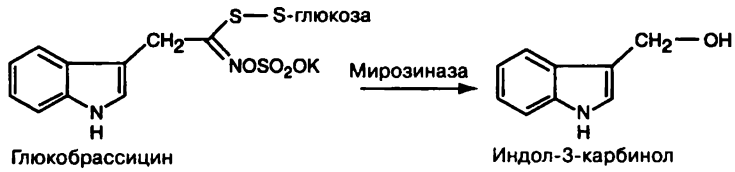


Рис. 12.12. Образование N,N'–ди(метилсульфинил) бутилтиомочевины из сульфорафана



Глюкобрассицин Индол-3-карбинол

Рис. 12.13. Образование индол-3-карбинола из глюкобрассицина под действием мирозиназы

протекторными свойствами благодаря способности инициировать активность цитохрома P450 (фермента первой фазы) и глютатион-S-трансферазы (фермента второй фазы), что приводит к усилению метаболизма относительно канцерогенов [57].

12.4. Общие механизмы защитного действия соединений растительного происхождения

Различные фитонутрицевтики обладают широким спектром полезных для здоровья человека свойств. Общие защитные механизмы этих соединений растительного происхождения основаны на их антиоксидантных свойствах, способности защищать ДНК от повреждений, на усилении иммунной функции и на модуляции гормональной активности [8, 20, 56].

Необходимым условием сохранения целостности клеточных структур и макромолекул является антиоксидантная защита от повреждений свободными радикалами [16]. По мере старения организма биохимические системы, использующие для защиты антиоксиданты, постепенно изнашиваются, защита ослабевает и организм остается незащищенным от окислительного стресса, еще более усиливающегося загрязнением окружающей среды, физическими нагрузками, курением и действием различных излучений. Эта система защиты обеспечивается сложными связями между витаминами C и E, каротиноидами, Zn-, Cu-, Se- и Mg-зависимыми антиоксидантыми ферментами и другими фитонутриентами, совместно участвующими в комплексных реакциях рециркуляции и регенерации и способствующими защите от свободных радикалов. Дефицит любого из вышеупомянутых компонентов может привести к серьезному ослаблению защитной системы организма [8, 16].

Окислительный стресс возникает из-за дисбаланса между образованием активных форм кислорода (АФК) и их удалением. К таким АФК относятся свободные гидроксильные радикалы, пероксильные радикалы, супероксиданионы и другие реакционноспособные соединения (например, пероксид водорода и синглетный кислород), которые являются продуктами естественных процессов, в том числе митохондриального переноса электронов и физических нагрузок или результатом действия внешних раздражителей — ионизирующей радиации солнца, загрязнителей окружающей среды, изменения атмосферных условий (гипоксия), вредных привычек (в том числе активного и пассивного курения), а также чрезмерного потребления алкоголя. В работе защитного механизма удаления АФК участвуют ферменты — супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и антиоксиданты — как нативные, так и поступившие в организм с пищей. В результате действия окислительного стресса макромолекулы (например, белки, ДНК и липиды) могут подвергаться окислительному повреждению (рис. 12.14).

Изменения структуры ДНК, разрыв цепи и мутации обычно связывают с действием свободных радикалов. Показано, что с помощью антиоксидантов эти повреждения можно остановить, уменьшить и даже вызвать их обратное развитие [72], причем не только у лиц, подвергавшихся максимальному окислительному стрессу (курильщиков), но и у тех испытуемых, у которых этот вид стресса не является основным фактором риска [72].

Важную роль в защите организма от воздействия различных патогенных агентов, в том числе мутированных и злокачественных клеток, играет иммунная система человека. Иммунная система с ее биоактивными соединениями, продуцируемыми интенсивно взаимодействующими клетками, весьма подвержена разрушительным воздействиям — стрессам, действию факторов окружающей среды, дефициту нутриентов, старению и т. п. Показано, что некоторые антиоксиданты улучшают иммунитет путем увеличения числа и активности клеток иммунной системы, в том числе, нативных клеток-«киллеров», Т-клеток и сиг-

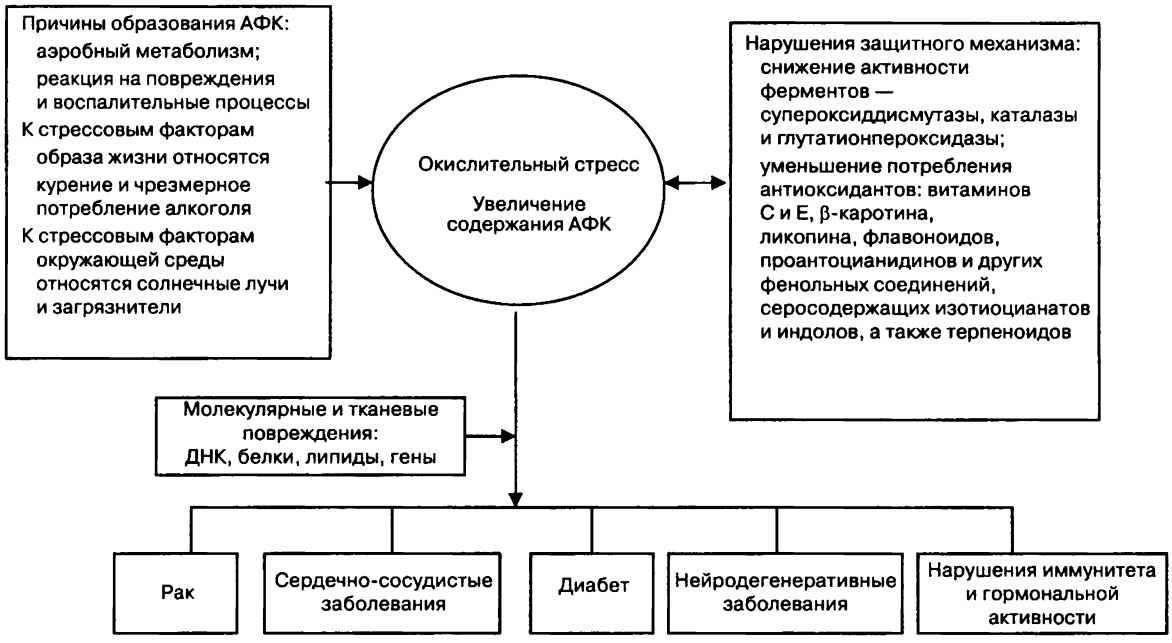


Рис. 12.14. Возможные последствия окислительного стресса

нальных рецепторов интерлейкина-2. Например, в модельных животных системах куркумин проявляет иммуномодулирующие свойства и препятствует развитию множественного склероза [5].

Противовоспалительное действие многих фитонутриентов довольно хорошо изучено [29]. Общий механизм их действия сводится к ингибированию индуцируемой формы циклооксигеназы (*COX*-2) и индуцируемой синтазы оксида азота (*iNOS*) [29]. Оба эти фермента участвуют в стимулируемых антителами воспалительных реакциях. Действие эффективных фитонутриентов основано на ингибировании инфомационной РНК и синтеза ассоциируемых с *COX*-2 и *iNOS* белков. Противовоспалительный механизм осуществляется путем ингибирования инициирующих воспалительные процесс цитокинов* или сигнальных путей и ядерного фактора транскрипции κB** [29]. Еще одним механизмом полезного для здоровья действия многих фитонутриентов является модулирование гормональной активности [4]. Фитоэстрогены обладают свойством тормозить развитие онкологических заболеваний, увеличивают плотность костей, улучшают состав липидов плазмы крови, снижают повышенный уровень холестерина в сыворотке крови и ослабляют климактерические симптомы [4]. Считается, что противораковое действие фитонутриентов частично обусловлено ингибированием ангиогенеза*** и/или активностью тирозинкиназы**** [66].

12.5. Биологически активные добавки к пище (БАД) растительного происхождения

Рост популярности продуктов на основе лекарственного сырья во всем мире, не говоря уже о странах, где эти растения давно используют в нетрадиционной медицине — Китае, Индии, Японии и Германии, связывают с необходимостью профилактики многих заболеваний. В настоящее время известно около

---

* Цитокины — это белковые вещества, необходимые для осуществления врожденного и адаптивного иммунных ответов. — *Примеч. авт.*

** Отсутствие регуляции данного фактора транскрипции зачастую бывает связано с развитием воспалительной реакции. — *Примеч. авт.*

*** Образование новых кровеносных сосудов, поддерживающее, в частности, быстрый рост раковых клеток. — *Примеч авт.*

**** Фермент, участвующий в трансдукции сигналов, особенно при пролиферации клеток. — *Примеч. авт.*

750 тыс. видов растений, из которых зарегистрировано 300 тыс., 30–75 тыс. признаны лекарственными, а 20 тыс. включены в перечень ВОЗ. На мировом рынке ведется активная торговля 400 видами лекарственных растений.

По нормативным актам США продукты из лекарственных растений считаются биологически активными добавками и могут реализовываться в разных товарных формах — от свежих растительных продуктов до сухих порошков, жидких и высушенных экстрактов, настоев и очищенных препаратов. Глобализация торговли делает доступными для потребителей в США любые виды продуктов растительного происхождения, среди которых ведущее место занимают женьшень, гинкго-билоба, чеснок, со пальметто (пальма Сереноа), эхинацея, соя, ирга, виноградные косточки и экстракты зеленого чая. Некоторые популярные биологически активные добавки растительного происхождения, их предполагаемые активные компоненты и функции представлены в табл. 12.3 [12].

В зависимости от назначения БАД растительного происхождения применяют различные стандарты контроля и менеджмента качества, но обычно действуют некоторые общие правила, а именно требования к аутентичности БАД растительного происхождения, их безопасности для здоровья, ограничения по содержанию посторонних примесей, тяжелых металлов, афлатоксинов и пестицидов. Кроме того, регулируется значение pH, зольность, содержание влаги и размер частиц. Все такие продукты должны проходить микробиологические исследования. Обычно стандарты качества вполне выполнимы, но по конкретным продуктам таких стандартов явно не хватает [67].

Таблица 12.3

Популярные БАД растительного происхождения, их потенциально активные компоненты и функции

БАД	Латинское наименование	Потенциально активные компоненты	Основная польза для здоровья
Астрагал	*Astragalus membranaceus*	Полисахариды, сапонины (астрагалозиды)	Иммуномодуляторное и гепатозащитное действие
Цимицифуга (клопогон кистевидный)	*Cimicifuga racemosa*	23-эпи-26-деоксиактеин фукиноловой кислоты	Ослабление симптомов менопаузы
Клюква	*Vaccinium macrocarpon*	Проантоцианидины	Профилактика и лечение инфекций мочевыводящих путей
Дудник китайский, Дань Гуй	*Angelica sinensis*	Лигустилид	Лечение гинекологических заболеваний
Эхинацея	*Echinacea purpurea, E. pallida, E. angustifolia*	Полисахариды и гликопротеины, цикоревая кислота, алкамиды	Лечение простуды, кашля, инфекций верхних дыхательных путей
Пиретрум	*Tanacetum parthenium*	Партенолиды и другие сесквитерпенлактоны	Ослабление симптомов простуды, головной боли, менструального болевого синдрома
Чеснок	*Allium sativum*	Аллильные серосодержащие соединения	Антибактериальное, антиканцерогенное, антитромботическое, гиполипидемическое действие
Имбирь	*Zingiber officinale Roscoe*	Гингеролы	Противорвотное, противовоспалительное действие, облегчение пищеварения
Гинкго билоба	*Ginkgo biloba*	Гинкголиды, флавоноиды	Лечение нарушений кровообращения, в том числе мозгового
Американский женьшень	*Panax quinquefolium*	Гинзенозиды	Улучшение иммунитета, лечение онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний и сексуальных расстройств
Азиатский женьшень	*Panax ginseng*	Гинзенозиды	Преодоление психофизической усталости и астении

Таблица 12.3 (окончание)

БАД	Латинское наименование	Потенциально активные компоненты	Основная польза для здоровья
Желтокорень канадский	*Hydrastis canadensis*	Алкалоиды берберин и β-гидрастин	Ослабление раздражения кожи и слизистых оболочек, облегчение расстройств пищеварения
Экстракт виноградных косточек	*Vitis vinifera*	Проантоцианидины	Антиоксидантное, противовоспалительное, иммуностимулирующее, противовирусное и противораковое действие
Полифенолы зеленого чая	*Camellia sinensis*	Эпигаллокатехингаллат и катехины	Профилактика сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, нейродегенеративных расстройств и диабета
Кава-кава (перец опьяняющий)	*Piper methysticum*	Лактоны кава-кава	Повышение настроения, расслабляющие свойства
Солодка (лакрица)	*Glycyrrhiza glabra*	Тритерпеновые сапонины, флавоноиды и другие фенольные соединения	Смягчающие, противовоспалительные и противокашлевые свойства
Мака перуанская	*Lepidium meyenii*	Ароматические изотиоцианаты	Афродизиак
Расторопша пятнистая	*Silybum marianum*	Силимарин	Лечение заболеваний печени
Пикногенол	*Pinus pinaster ssp. Atlantica*	Процианидины	Защиты системы кровообращения, восстановления капилляров
Клевер луговой	*Trifolium pratense*	Изофлавоны	Лечение симптомов менопаузы
Трутовик лакированный (рейши)	*Ganoderma lucidum*	Тритерпеноиды, полисахариды	Противоопухолевое и иммуномодулирующее действие
Пальма серенoа	*Serenoa repens*	Нет данных	Профилактика заболеваний простаты
Соя	*Glycine max*	Генистеин, даидзеин	Предотвращение симптомов менопаузы, остеопороза, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний
Зверобой	*Hypericum perforatum*	Гиперфорин, гиперцин	Лечение легкой степени депрессии
Валериана	*Valeriana officinalis L.*	Валепотриат (иридоид)	Мягкое седативное действие, лечение расстройств сна
Йохимбе	*Pausinystalia johimbe*	Иохимбин	Афродизиак

12.6. Нутрицевтики, образующиеся при переработке пищевых продуктов

Практически все потребляемые человеком пищевые продукты подвергаются той или иной технологической переработке, которая играет важную роль в обеспечении их качества, безопасности для здоровья, срока хранения, а также свойств конкретных продуктов. Химические реакции при технологической обработке сложны и многочисленны — некоторые биоактивные соединения разрушаются, а другие в необработанных тканях или сырье отсутствуют и появляются лишь в готовом продукте, причем некоторые из них весьма благоприятно влияют на здоровье.

В природе довольно часто встречаются гидроксикоричные кислоты, в частности феруловая и кофеиновая. В овощах, фруктах и злаковых культурах они присутствуют в свободной форме или в виде простых эфиров. Особенно высоко содержание соединений гидроксикоричной кислоты в кофейных зернах — в необжаренных содержится около 6–9% хлорогеновой кислоты (хининового эфира кофейной кислоты)

[14]. При обжарке содержание хлорогеновой кислоты существенно снижается. Обжаренный кофе обладает антиканцерогенными и антибактериальными свойствами, что позволяет высказать предположение о биологической активности продуктов разложения хлорогеновой кислоты [15].

Кофейная кислота — это один из основных катехоловых компонентов в необжаренных зернах кофе. При термообработке кофейная кислота быстро вступает в реакцию декарбоксилирования с образованием простых катехоловых мономеров и более сложных конденсированных циклических димеров и полимеров. В результате мягкого пиролиза кофейной кислоты образуются два основных компонента — 1,3-*цис*- и 1,3-*транс*-тетраоксигенированные фенилинданы. Результаты исследований *in vitro* свидетельствуют, что эти два компонента обладают потенциальными антиоксидантными и антимутагенными свойствами (механизм их образования приведен на рис. 12.15). В обжаренном кофе содержание этих соединений составляет от 10 до 15 мг/кг [58].

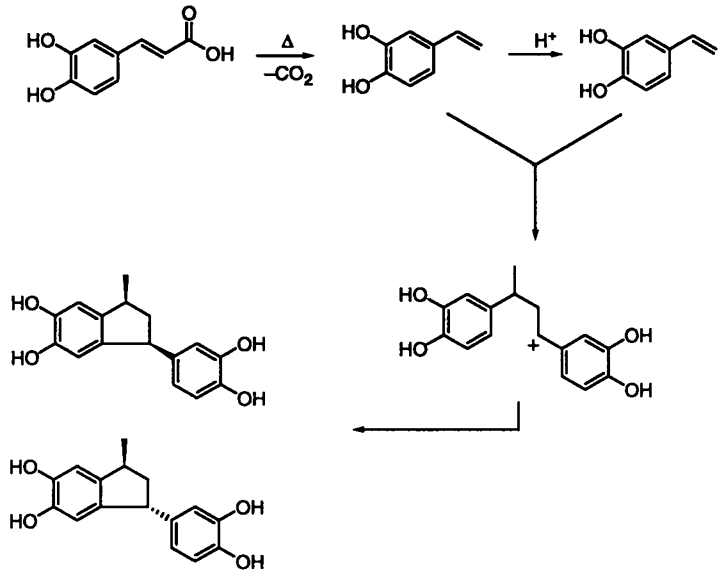


Рис. 12.15. Образование из кофейной кислоты 1,3-тетраоксигенированных фенилинданов

Наличие тепловой энергии — не единственная причина преобразований биоактивных веществ в пищевых продуктах. Воздействие кислоты в процессе переработки также вызывает их превращения, примером чего может служить образование активного антиоксиданта в кунжутном масле в процессе очистки. В семенах кунжута содержится один из основных лигнанов — сезамолин. В процессе рафинирования кунжутного масла содержание сезамолина возрастает до 0,5–1,0 мг/г в результате превращения сезамолина в сезаминол путем межмолекулярного переноса групп при участии в качестве катализатора кислой отбеливающей глины [22]. Механизм образования сезаминола приведен на рис. 12.16. Именно сезаминол обусловливает антиоксидантные свойства масла из необжаренных семян кунжута. Многие лигнаны, как и изофлавоны, считаются фитоэстрогенами.

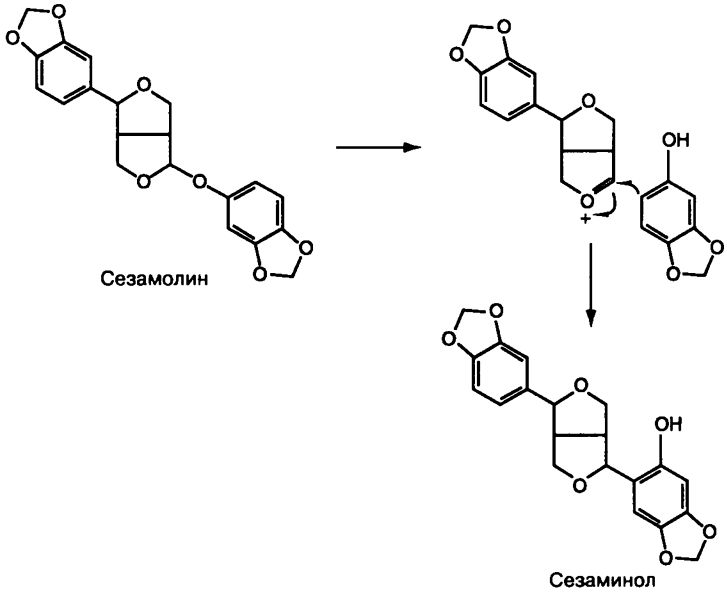


Рис. 12.16. Образование сезаминола из сезамолина

12.7. Биодоступность биологически активных соединений

Биодоступность характеризует степень доступности для организма лекарственного средства, нутриента, биологически активной добавки или нутрицевтика. На биодоступность влияет степень всасывания и распространения по организму человека. Проблемы с определением биодоступности возникают при необходимости точного определения дозировки, позволяющей обеспечить желаемый физиологический эффект.

Производители выпускают пилюли с витамином С массой по 500 мг, однако они не могут с уверенностью заявлять, что все эти 500 мг будут усвоены и утилизированы организмом.

Многое зависит от конкретного человека и потребляемых им с пищей веществ, то есть организмы двух людей, получающих одну и ту же дозу некоторого вещества, усваивают различные его количества. Это происходит из-за различий во всасывании, распределении, метаболизме и выведении (*ADME, absorption, distribution, metabolism and excretion*) лекарственного или пищевого вещества. Именно поэтому для кого-то предписанная дозировка может оказаться менее эффективной, чем для другого человека; прием таблетки в 500 мг не всегда означает, что организм способен усвоить все это количество. Кроме того, в некоторых случаях потребляемое соединение не является конечным биологически активным веществом. Многие молекулы поступают в систему пищеварения, где они превращаются в другие метаболиты, взаимодействующие между собой в процессе всасывания. Судьба метаболитов многих потребляемых биологически активных веществ пока еще недостаточно изучена, что затрудняет понимание и оценку степени их биодоступности. Известно, например, что с мочой выделяется около 11% кофейной кислоты и следовые количества хлорогеновой кислоты, содержащихся в кофе [42], но что именно происходит с оставшейся кофейной кислотой, до сих пор неизвестно. Такая неопределенность не позволяет до конца осознать феномен биодоступности, причем это относится к большинству нутрицевтиков.

Несмотря на то что невозможно с определенностью сказать, сколько именно вещества будет усвоено и использовано организмом, существуют серьезные свидетельства в пользу того, что в некоторых случаях усваиваются очень малые количества тех или иных веществ. Например, при изучении хлорогеновой кислоты было установлено, что с мочой в неизменном виде выделяется лишь 1,7%.

В этих случаях в метаболизме полифенолов бóльшую роль должна играть толстая кишка. Полифенолы, достигшие толстой кишки, расщепляются ее микробиотой на более мелкие метаболиты. Бактерии толстой кишки способны расщеплять фенолы, обеспечивая всасывание их более мелких метаболитов почками, печенью и другими органами, после чего эти мелкие метаболиты переходят в мочу. Не имея ясного представления о химической природе этих метаболитов, мы не можем контролировать их присутствие в моче. В результате делается вывод, что бóльшая часть усвоенных полифенолов, скорее всего, в виде мелких метаболитов вообще не попадает в периферическую систему кровообращения [43].

Проблема снижения антиоксидантных свойств у более мелких метаболитов, образовавшихся из крупных молекул, значительно осложняет изучение биодоступности тех или иных веществ. Вряд ли в организм всасывается вся доза потребленного вещества, но вполне вероятно, что оно расщепляется на более мелкие, до сих пор не идентифицированные компоненты. С учетом этого очень трудно прогнозировать общее действие нутрицевтиков, БАД и соединений из растительного сырья на клетки организма.

12.8. Природные токсиканты растительного происхождения

В растительном мире (и соответственно, в пищевых продуктах) существует огромное количество токсичных веществ и «антинутриентов». С эволюционной точки зрения эти вещества должны защищать растение от хищничества (табл. 12.4, по [48]) [3]. Некоторые из этих растительных токсинов признаны канцерогенными (табл. 12.5), а некоторые из них, особенно жирорастворимые, даже способны к накоплению в организме [49]. Вместе с тем известно совсем немного случаев, когда такие природные токсиканты наносили вред здоровью человека при нормальном рационе.

Существует так называемое пищевое отравление пирролизидиновыми алкалоидами, которое вызывается веществами растительного происхождения [52]. Эти алкалоиды весьма распространены в царстве растений и содержатся в растениях самых разных семейств, в том числе бурачниковых, сложноцветных и бобовых. Общая циклическая структура этих соединений показана на рис. 12.17. Отравление ими может произойти самыми разными путями: через молоко от коров, питавшихся кормом, в котором содержались алкалоиды, а также через зерно злаковых культур с примесью сорняков, в которых присутствовали данные алкалоиды [52]. Пирролизидиновые алкалоиды могут вызвать поражения печени (от средней тяжести до тяжелых) и желудочно-кишечные расстройства (рвоту, боли в животе, асцит) вплоть до летального исхода.

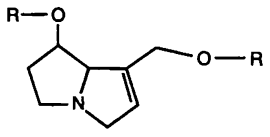


Рис. 12.17. Структрная формула пирролизидиновых алкалоидов

Таблица 12.4
Некоторые природные токсиканты растительного происхождения. По [48]

Токсины	Химическая природа	Основной источник	Основные симптомы токсического действия пищевого отравления
Ингибитор протеазы	Белки (молекулярная масса 4000–24 000)	Бобовые (соя, фасоль золотистая и обыкнобвенная, лимская фасоль, турецкие бобы), горох, картофель (батат), злаковые культуры	Нарушение роста и усвоения пищи; гипертрофия поджелудочной железы
Гемагглютенины	Белки (молекулярная масса 10 000–124 000)	Бобовые — клещевина, соя, фасоль обыкновенная, черная и желтая, канавалия мечевидная, чечевица, горох	Нарушения роста и усвоения пищи; агглютинация эритроцитов *in vitro*; митогенное действие на клеточные культуры *in vitro*
Сапонины	Стероидные или тритерпеновые гликозиды	Соевые бобы, сахарная свекла, шпинат, спаржа, арахис	Гемолиз эритроцитов *in vitro*
Глюкозинолаты (некоторые)	Тиогликозиды	Капуста и родственные ей культуры, репа, брюква, редис, рапс, горчица	Гипотиреоидизм (гипотиреоз), увеличение щитовидной железы
Цианогены	Цианогенные глюкозиды	Горох и фасоль, бобы, семена льна, лен, семена и косточки фруктов, кассава	Отравление синильной кислотой
Госсиполовые пигменты	Госсипол	Семена хлопчатника	Нарушения работы печени, кровоизлияния, отеки
Латирогены	β-Аминопропионитрил и его производные	Турецкие бобы, вика	Нейролатиризм (поражение центральной нервной системы)
Аллергены	Белки (вероятно)	Все виды продуктов, особенно из зерна, бобовых и орехов	Аллергическая реакция чувствительных индивидов
Циказин	Метилазоксиметанол	Орехи растений семейства саговниковых (*Cycas)*	Рак печени и других органов
Токсин бобов фава	Вицин и конвицин (β-глюкозиды пирамидина)	Бобы фава (бобы садовые, бобы конские)	Острая гемолитическая анемия
Фитоалексины	Простые фураны (ипомеамарон)	Сладкий картофель	Отек легких; поражение печени и почек
	Бензофураны (псоралены)	Сельдерей, репа	Фотосенсибилизация
	Ацетилированные фураны	Кормовые бобы	Лизис клеток *in vitro*
	Изофлавоноиды (писаин и фазеолин)	Горох, зеленостручковая фасоль	
Пирролизидиновые алколоиды	Дигидропирролы	Растения семейства сложноцветных и бурачниковых, травяные чаи	Поражение печени и легких; канцерогенное действие
Сафрол	Аллил-замещенный бензол	Сассафрас, черный перец	Канцерогенное действие
α-Амантин	Бициклические октапептиды	Бледная поганка (*Amanita phalloides*), другие ядовитые грибы	Обильное слюноотделение, рвота, судороги вплоть до летального исхода
Атрактилозид	Стероидный гликозид	Череполох (*Atractylis gummifera*)	Истощение запасов гликогена

Таблица 12.5
Некоторые канцерогены пищевых продуктов. По [48]

Канцерогены (для грызунов)	Пищевые продукты растительного происхождения	Содержание, мг/кг
5- или 8-метоксипсорален	Петрушка	14
	Репа отварная	32
	Сельдерей	0,8
	Сельдерей, новый сорт	6,2
	Сельдерей, в условиях стресса	25
p-Гидразинобензоат	Грибы	11
Глютамил-*p*-гидразинобензоат	Грибы	42
Синигрин (аллилизотиоцианат)	Капуста кочанная	35–590
	Капуста листовая	250–788
	Цветная капуста	12–66
	Брюссельская капуста	110–1560
	Горчица (сарептская, коричневая)	16 000–72 000
	Хрен	4500
Эстрагол	Базилик	3800
	Фенхель	3000
Сафрол	Мускатный орех	3000
	Рогоз	10 000
	Перец черный	100
Этилакрилат	Ананас	0,07
Сезамол	Семена кунжута (кунжутное масло, подвергнутое тепловой обработке)	75
α-Метилбензиловый спирт	Какао-бобы	1,3
Бензилацетат	Базилик	82
	Жасминовый чай	230
	Мед	15
	Кофе (обжаренные зерна)	100
Кофейная кислота	Яблоки, морковь, сельдерей, вишня, баклажан, эндивий, виноград, салат-латук, груша, слива, картофель	50
	Абсент, анис, базилик, тмин, укроп, майоран, розмарин, шафран, чабер, эстрагон, тимьян	> 1000
	Кофе (обжаренные зерна)	1800
	Абрикосы, вишня, персики, слива	50–500
Хлорогеновая кислота (из кофейной кислоты)	Кофе (обжаренные зерна)	21 600
Неохлорогеновая кислота	Яблоки, абрикосы, капуста-брокколи, брюссельская и белокочанная и листовая капуста, вишня, персики, груши, сливы	50–500
	Кофе (обжаренные зерна)	11600

Некоторые токсины в сравнительно малых количествах присутствуют в растениях, входящих в ежедневный рацион людей. Определенную опасность представляют собой токсины семейства цианогенных гликозидов, которые при употреблении в пищу метаболизируются до синильной кислоты (HCN) [52]. В съедобных растениях выявлено три цианогенных гликозида: амигдалин (цианогидрина бензальдегид, β-глюкозидо-6-β-глюкозид), дхуррин (*p*-гидроксибензальдегида цианогидринглюкозид) и линамарин (ацетонцианогидрина глюкозид) (рис. 12.18) [52]. Амигдалин содержится в горьком миндале, дхуррин —

в сорго, а лимарин — в бобовых растениях, семенах хлопчатника и в кассаве. В косточках абрикоса содержится 2,92 мг HCN (продукта разложения цианогеного гликозида)/г, в косточках персика —2,69 мг/г, а в семечках яблока — 0,61 мг/г [26]. Механизм высвобождения HCN при гидролизе линамарина показан на рис. 12.19.

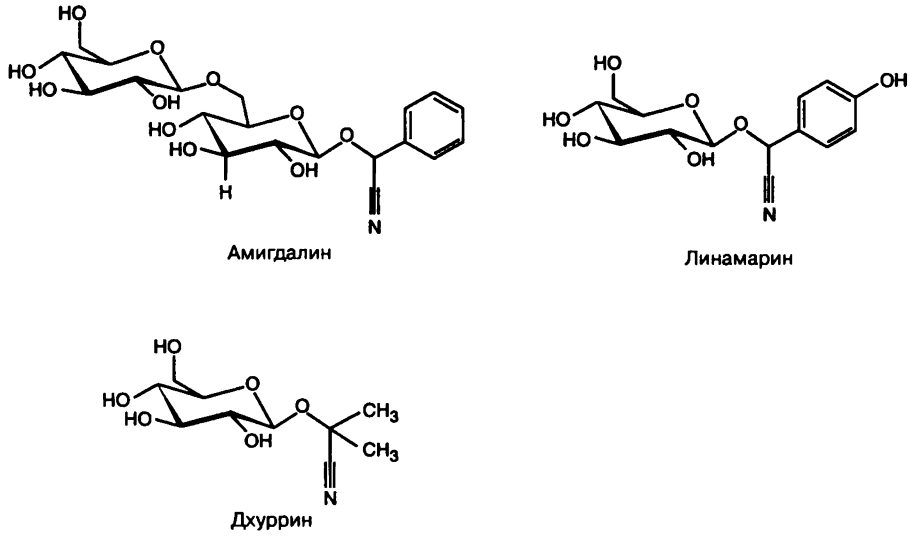


Рис. 12.18. Структурные формулы амигдалина, линамарина и дхуррина

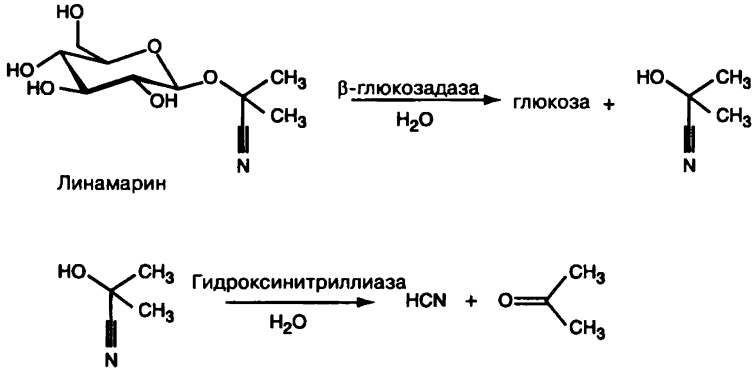


Рис. 12.19. Гидролиз линамарина с образованием HCN

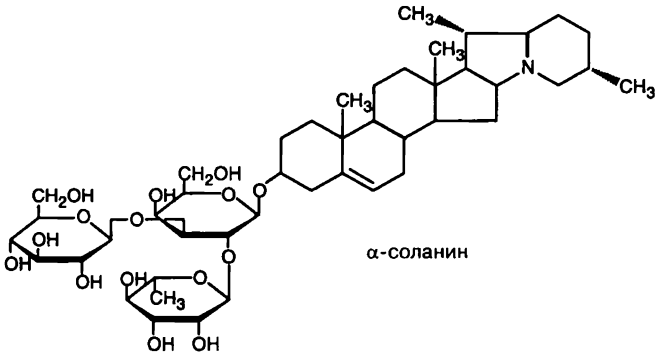
В картофеле содержатся два алкалоидных гликозида — α-соланин и α-хаконин (рис. 12.20), которые в высокой концентрации токсичны. В норме общее содержание гликоалколоидов в картофеле составляет от 2 до 10 мг/100 г. По нормам *FDA* содержание солонина в картофеле ограничено 20 мг/100 г [52].

Другие токсиканты, например, госсипол и некоторые родственные ему соединения, содержатся в пигментных желёзках семян хлопчатника. У домашних животных они могут привести к разным симптомам отравления (снижению репродуктивной способности, задержкам роста и т. п.), а также вызывают снижение пищевой ценности муки из семян хлопчатника. Не усваиваемые организмом оксалаты присутствуют в шпинате, ревене, томатах — они снижают растворимость цинка, железа и кальция [52].

12.9. Токсиканты пищевых продуктов, образующиеся при переработке

Химические реакции, инициируемые в пищевых продуктах при тепловой обработке, в некоторых случаях необходимы для развития требуемых вкусоароматических свойств, но они могут быть и вредными (если, например, при их протекании образуются токсичные химические соединения, например гетероциклические ароматические амины и акриламид).

Нагревание белковых пищевых продуктов, в частности мяса, приводит к образованию следовых количеств гетероциклических ароматических аминов — аминоимидазоазааринов (*AIA*), являющихся сильнодействующими мутагенами [62]. Наиболее распространенные *AIA* приведены на рис. 12.21. Из отваренных, высушенных на солнце сардин были выделены 2-амино-3-метилимидазо[4,5-*f*]хинолин (*IQ*) и 2-амино-3,4–диметилимидазо[4,5-*f*]хинолин (*MeIQ*) [36], а из жареных мясных продуктов — 2-амино-



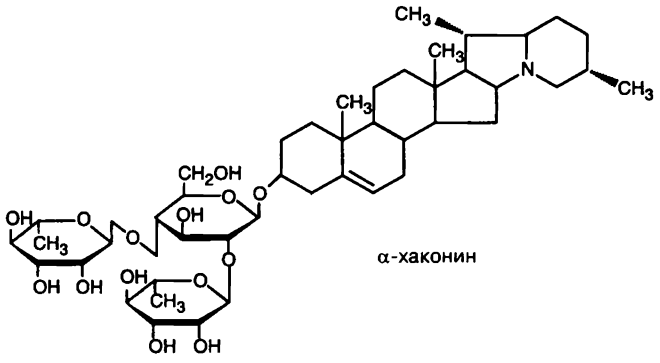
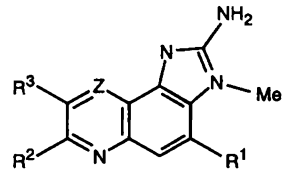


Рис. 12.20. Структурные формулы α-соланина и α-хаконина



Сокращенное обозначение	Z	R^1	R^2	R^3
IQ	C	H	H	H
MeIQ	C	Me	H	H
MeIQx	N	H	H	Me
4,8-DiMeIQx	N	Me	H	Me

Рис. 12.21. Структурная формула наиболее распространенных аминоимидазоазаринов (*AIA*)

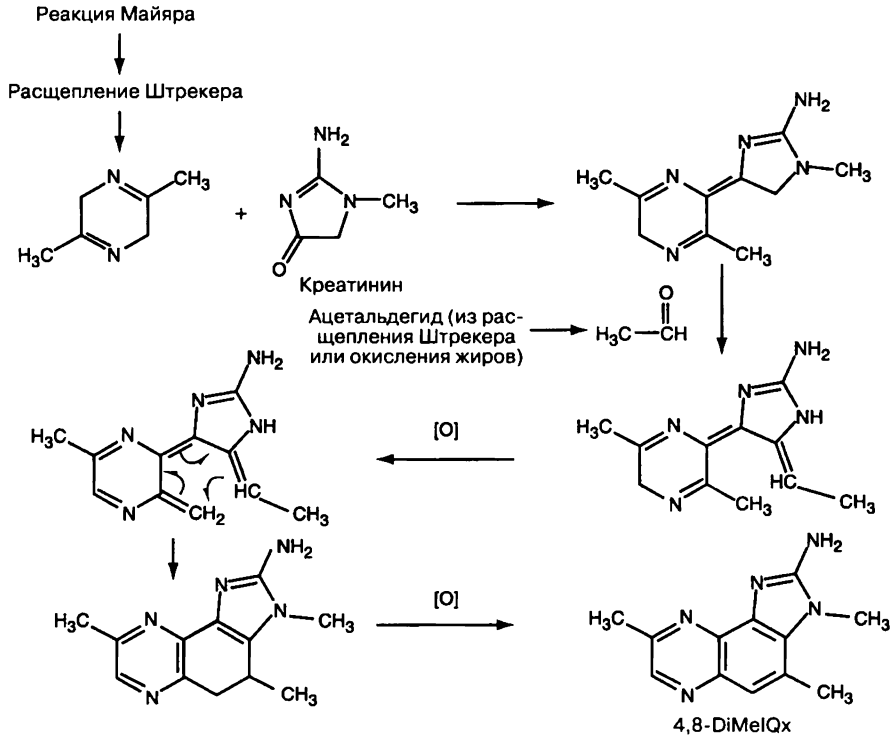


Рис. 12.22. Механизм образования 4,8-DiMeIQx

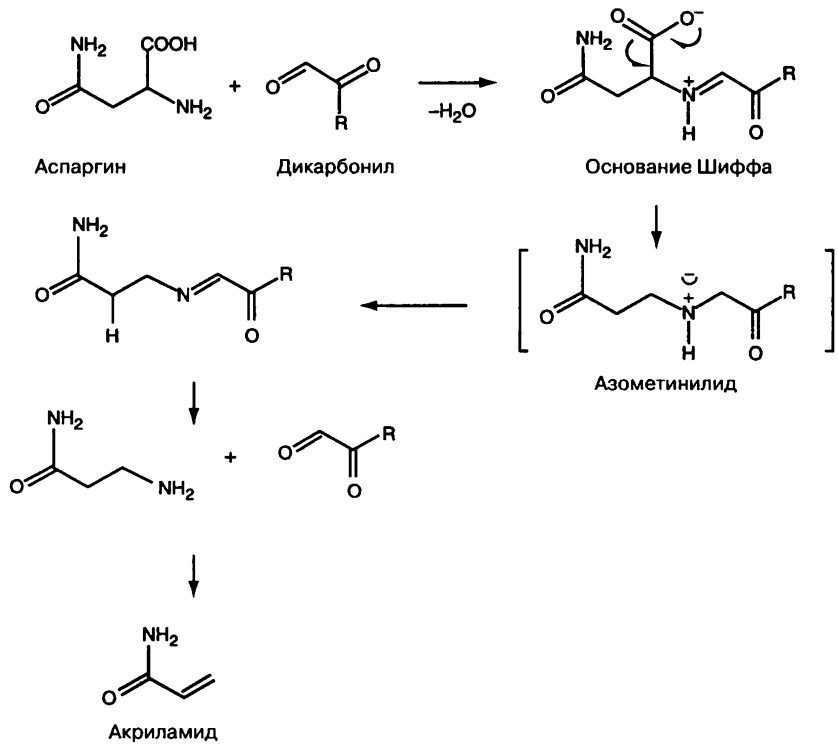


Рис. 12.23. Механизм образования акриламида из аспарагина на первом этапе реакции Майяра

3,8-диметилимидазо[4,5-*f*]хиноксалин (*MeIQx*) и 2-амино-3,4,8–триметилимидазо[4,5-*f*]хиноксалин (4,8-*DiMeIQx*), а также *IQ* и *MeIQ* [32].

Несмотря на то что механизм образования гетероциклических ароматических аминов в пищевых продуктах еще недостаточно изучен, считается, что 2-аминоимидазовая часть молекулы образуется при участии нативного для мышечной ткани креатина [32], а хинолиновая и хиноксалиновая части молекулы образуются из продуктов реакции Майяра, в частности, предшественников пиразинов, пирадинов или альдегидов [32]. Возможный механизм образования 4,8-*DiMeIQx* показан на рис. 12.22. На первом этапе происходит реакция Майяра между редуцирующим сахаром и аминокислотами с образованием химически активных дикарбонильных соединений (например, пирувальдегида). Затем между дикарбонильным соединением и аминокислотой происходит расщепление Штрекера с образованием химически активной молкулы дигидропиразина. Наконец, путем конденсации дигидропиразина, креатинина и ацетатальдегида образуется крупная молекула 4,8-*DiMeIQx*. Ацетатальдегид — это продукт расщепления Штрекера аминокислот — аланина или цистеина. С другой стороны, ацетатальдегид — это важный продукт окисления жиров, что, возможно, объясняет, почему в присутствии триацилглицеринов образование гетероциклических ароматических аминов усиливается [34].

Еще одним потенциальным пищевым токсикантом, образующимся в ходе реакции Майяра, является акриламид, хорошо изученный нейротоксин. У животных он ослабляет репродуктивную способность и проявлет генотоксичные и канцерогенные свойства [21]. В 2002 г. появилась информация, что большие количества акриламида могут содержаться в богатых углеводами продуктах, подвергнутых тепловой обработке [64]. Основной способ образования акриламида — это реакции Майяра [40, 59]. Механизм образования акриламида из аспарагина на первой стадии реакции Майяра показан на рис. 12.23 [59]. В настоящее время существует большая озабоченность относительно рисков для здоровья человека, обусловленных возможным потреблением акриламида с пищевыми продуктами, однако проводившиеся исследования не выявили никакой связи между потреблением акриламида с пищевыми продуктами и возникновением рака толстой кишки, почек и мочевого пузыря [41].

Литература

1. Aggarwal, B. B., Kumar, A., Aggarwal, M. S. and Shishodia, S. (2005). Curcumin derived from turmeric *(Curcuma longa):* a spice for all season. In *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention* (D. Bagchi and H. G. Oreuss, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 349–387.
2. Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R. and Kinae, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr. 130:* 2243–2250.
3. Bondi, A. and Alumot, E. (1987). Anti–nutritive factors in animal feedstuffs and their effects on livestock. *Prog. Food Nutr. Sci. 11:* 115–151.
4. Branca, F. and Lorenzetti, S. (2005). Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr. 57:* 100–111.
5. Bright, J. J. (2004). Targeting autoimmune diseases through nutraceuticals. *Nutrition 20:* 39–43.
6. Burrie, B. J. (1997). β–Carotene and human health: a review of current research. *Nutr. Res. 17:* 547–580.
7. Burton, G. W. and Ingold, K. U. (1984). β–Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science 224:* 569–573.
8. Calder, P. C and Kew, S. (2002). The immune system: a target for functional foods? *Br. J. Nutr. 88 (Suppl. 2):* S165–S177.
9. Chen, C. C, Rosen, R. T. and Ho, C.–T. (1986). Chromatographic analyses of shogaol compounds derived from isolated gingerol compounds of ginger *(Zingiber officinale* Roscoe). *J. Chromatogr.* 360: 175–184.
10. Chew, E. Y. (1995). Nutritional supplement use and age–related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol. 6:* 19–24.
11. Chung, F. L. (2002). Dietary isothiocyanates: role in cancer prevention and metabolism in rodents and humans. In *Phytochemicals in Nutrition and Health* (M. S. Meskin, W. R. Bidlack, A. J. Davies and S. T. Omaye, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 87–104.
12. Coates, P., Blackman, M. R., Cragg, G M., Levine, M., Moss, J. and White, J. D. (2005). *Encyclopedia of Dietary Supplements,* Marcel Dekker, New York.
13. Cui, H. B., Na, X. L., Song, D. F. and Lui, Y. (2005). Blocking effects of genistein on cell proliferation and possible mechanisms in human gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol. 11:* 69–72.
14. Daglia, M., Cuzzoni, M. T. and Dacarro, C. (1994). Antibacterial activity of coffee. *J. Agric. Food Chem. 42:* 2270–2272.
15. Daglia, M., Cuzzoni, M. T. and Dacarro, C. (1994). Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. *J. Agric. Food Chem. 42:* 2273–2277.
16. De la Fuente, M. (2002). Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur. J. Clin. Nutr. 56 (Suppl. 3):* S5–S8.
17. De Naeyer, A., Berghe, W. V., Dde Keukeleire, D. and Haegeman, G (2005). Phytoestrogens in cancer prevention: characterization and beneficial effects of kurarinone, a new flavanone and a major phytoestrogen constituent of *Sophora flavescens* Ait. In *Phytopharmaceuticals in Cancer Prevention* (D. Bagchi and H. G Preuss, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 427–448.
18. De Pascual, T. S., Johnston, K. C and Dupont, M. S. (2004). Quercetin metabolic downregulates cyclooxygenase 2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo. J. Nutr. 3:* 552–557.
19. Ding, G, Naora, K,, Hayashibara, M., Katagiri,Y, Kano,Y.andlwamoto, K. (1991). Pharmacokinetics of [6]–gingerol after intravenous administration in rats. *Chem. Pharm. Bull. 396:* 1612–1614.
20. Fenech, M., Stockley, C. and Aitken, C. (1997). Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide–induced DNA damage. *Mutagenesis 12:* 289–296.
21. Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem. 51:* 4504–4526.
22. Fukuda, Y, Osawa, T., Kawakishi, S. and Namiki, M. (1994). In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices, and Herbs* (C.–T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang and R. T. Rosen, eds.), ACS Symposium Ser. 547, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 264–274.
23. Hathcock, 1(2001). Dietary supplements: howthey are used and regulated.J.Ator. *131:*1114S–1117S.
24. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C H., Katan, M. B. and Kromhout, D. (1993). Dietary anti–oxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet 342:* 1007–1011.
25. Ho, C.–T., Ferraro, T., Chen, Q., Rosen, R. T. and Huang, M. T. (1994). Phytochemicals in teas and rosemary and their cancer–preventive properties. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices, and Herbs* (C.–T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang and R. T. Rosen, eds.), ACS Symposium Ser. 547, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 2–19.
26. Holzbecher, M., Moss, M. and Ellenberger, H. (1984). The cyanide content of Laetrile preparations, apricot, peach and apple seeds. *Clin. Toxicol. 22:* 341–347.
27. Hu, F. B. (2002). Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr. Opin. Lipidol. 13:* 3–9.
28. Huang, M. T. and Ferraro, T. (1992). Phenolic compounds in food and cancer prevention. In *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants & Cancer Prevention* (M. T. Huang, C.–T. Ho and C. Y. Lee, eds.), ACS Symposium Ser. 507, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 8–34.
29. Huang, M. T., Ghai, G and Ho, C.–T. (2004). Inflammatory process and molecular targets for anti–inflammatory nutraceuticals. *Comp. Rev. FoodSci. Food Safety 3:* 127–139.
30. Ireson, C R., Jones, D. J. L., Orr, S., Coughtrie, M. W H., Boocock, D. J., William, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P. and Gescjer, A. J. (2002). Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 11:* 105–111.

31. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C R, Beecher, C W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G, Moon, R. C and Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science 275:* 218–220.
32. Jagerstad, M., Laser Reutersward, A., Oste, R., Dahlqvist, A., Olsson, K., Grivas, S. and Nyhammar, T. (1983). Creatinine and Maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. In *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition* (G. Waller and M. Feather, eds.), ACS Symposium Ser. 215, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 507–519.
33. Jin, Y, Wang, M., Rosen, R. T. and Ho, C.–T. (1999). Thermal degradation of sulforaphane in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem. 47:* 3121–3123.
34. Johansson, M., Skog, K. and Jagerstad, M. (1993). Effects of edible oils and fatty acids on the formation of mutagenic heterocyclic amines in a model system. *Carcinogenesis 14:* 89–94.
35. Johnson, E. J. and Russell, R. M. (2005). β–Carotene. In *Encyclopedia of Dietary Supplements* (P. Coatcs, M. R. Blackman, G. M. Cragg, M. Levine, J. Moss and J. D. White, eds.), Marcel Dekker, New York, NY, pp. 81–87.
36. Kasai, H. Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T. and Nishimura, S. (1980). Structure and chemical synthesis of Me–IQ, a potent mutagen isolated from boiled fish. *Chem. Lett.* 1391–1394.
37. Manach, C, Scalbert, A., Morand, C, Ramesy, C and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr. 79:* 727–741.
38. Mehta, R. G and Pezzuto, J. M. (2005). Phytochemicals as potential cancer chemopreventive agent. In *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention* (D. Baghi and H. G. Preuss, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 237–246.
39. Milner, J. A. (2005). Garlic *(Allium sativum).* In *Encyclopedia of Dietary Supplements* (P. Coates, M. R. Blackman, G. M. Cragg, M. Levine, J. Moss and J. D. White, eds.), Marcel Dekker, New York, NY, PP– 229–240.
40. Mottram, D. S. Wedzicha, B. L. and Dodson, A. T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature 419:* 448–449.
41. Mucci, L. A., Dickman, P. W, Steineck, G, Adami, H. O. and Augustsson, K. (2003). Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population–based study in Sweden. *Br. J. Cancer 88:* 84–89.
42. Olthof, M. R., Hollman, P. C, Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M. and Katan, M. B. (2003). Chlorogenic acid, quercetin–3–rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr. 133:* 1806–1814.
43. Olthof, M. R., Hollman, P. C. and Katan, M. B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr. 131:* 66–71.
44. Omenn, G S., Goodman, G E., Thornquist, M. D., et al. (1996). Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta–carotene and retinol efficacy trial. *J. Natl Cancer Inst. 88:* 1550–1559.
45. Palozza, P. and Krinsky, N. I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro:* an overview. *Methods Enzymol. 213:* 403–420.
46. Pan, M. H., Chen, W. J., Lin–Shiau, S. Y, Ho, C.–T. and Lin, J. K. (2002). Tangeretin induces cell–cycle Gl arrest through inhibiting cyclin–dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma celis. *Carcinogenesis 23:* 1677–1684.
47. Paolini, M., Cantelli–Forti, G, Perocco, P., Pedulli, G R, Abdel–Rahman, S. Z., and Legator, M. S. (1999). Co–carcinogenic effect of □–carotene. *Nature 398:* 760–761.
48. Pariza, M. W. (1996). Toxic substances. In *Food Chemistry,* 3rd edn. (O. R. Fennema, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 825–840.
49. Peraica, M. and Domijan, A. M. (2001). Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh. Hig. Rada. Toksikol. 52:* 23–35.
50. Rasmussen, S. E., Fredeiksen, H., Krogholm, K. S. andPoulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res. 49:* 159–174.
51. Reuter, H. D., Koch, H. P. and Lawson, L. D. (1996). Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. In *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species,* 2nd edn. (H. P. Koch and L. D. Lawson, eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, pp. 135–212.
52. Rietjens, I. M. C M., Martena, M. J., Boersma, M. G, Spiegelenberg, W. and Alink, G. M. (2005). Molecular mechanisms of toxicity of important food–borne phytotoxins. *Mol. Nutr. Food Res. 49:* 131–158.
53. Rissanen, T. H., Voutilainen, S., Virtanen, J. K. Venho, B., Vanharanta, M., Mursu, J. and Salonen, J. T. (2003). Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) study. /. *Nutr. 133:* 199–204.
54. Roa, A. V. and Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr. Res. 19:* 305–323.
55. Sang, S., Lambert, J. D., Ho, C.–T. and Yang, C S. (2005). Green tea polyphenols. In *Encyclopedia of Dietary Supplements* (P. Coates, M. R. Blackman, G M. Cragg, M. Levine, J. Moss and J. D. White, eds.), Marcel Dekker, New York, NY, pp. 327–336.
56. Somjen, D., Knoll, E., Vaya, J., Stern, N. and Tamir, S. (2004). Estrogen–like activity of licorice root constituents: glabridin and

glabrene, in vascular tissues *in vitro* and *in vivo. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 91:* 147–155.
57. Sparnins, V. L., Venogas, P. L. and Wattenberg, L. W. (1982). Glutathione–S–transferase activity: enhancement by dietary constituents. *J. Natl Cancer Inst. 66:* 769–771.
58. Stadler, R. H. Welti, D. H., Stampfli, A. A. and Fay, A. A. (1996). Thermal decomposition of caffeic acid in model systems: identification of novel tetraoxygenated phenylindan isomers and their stability in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem. 44:* 898–905.
59. Stadler, R. H., Robert, R, Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J. and Blank, I. (2004). In–depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem. 52:* 5550–5558.
60. Stahl, W. (2005). Macular carotenoids: lutein and zeaxanthin. *Dev. Ophthalmol.* 38: 70–88.
61. Stahl, W. and Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys. 336:* 1–9.
62. Sugimura, T., Sato, S. and Wakabayashi, K. (1988). Mutagens/carcinogens in pyrolysates of aminoacids and proteins and in cooked foods: heterocyclic aromatic amines. In *Chemical Induction of Cancer: Structural Bases and Biological Mechanisms* (Y. Woo, D. Y. Lai, J. C. Aros and M. F. Argus, eds.), Academic Press, San Diego, CA, pp. 681–710.
63. Surh, Y. J., Na, H. K. and Lee, H. J. (2004). Chemopreventive effects of selected spice ingredients. In *Phytopharmaceuticals in Cancer Prevention* (D. Bagchi and H. G Preuss, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 575–598.
64. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Toernqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J *Agric. Food Chem. 50:* 4998–5006.
65. Thomson, M. and Ali, M. (2003). Garlic *(Allium sativum):* a review of its potential use as an anti–cancer agent. *Curr. Cancer Drug Targets 3:* 67–81.
66. Valachovicova, T., Slivova, V. and Sliva, D. (2004). Cellular and physiological effects of soy flavonoids. *Mini Rev. Med. Chem. 4:* 881–887.
67. Wang, M., Wu, Q. L., Simon, J. E., Jin, Y. and Ho, C.–T. (2005). Chemistry, pharmacology, and quality control of selected popular Asian herbs in the US market. In *Asian Functional Foods* (J. Shi, F. Shahidi and C.–T. Ho, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 73–102.
68. Wang, X. D. and Russell, R. M. (1999). Procarcinogen and anticarcinogen effect of β–carotene. *Nutr. Rev. 57:* 263–272.
69. Wu, J. M., Lu, X., Guo, J. and Hsieh, T. C (2004). Vascular effects of resveratrol. In *Phytochemicals: Mechanisms of Action* (M. S. Meskin, W. R. Bidlack, A. J. Davies, D. S. Lewis and R. K. Randolph, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 145–161.
70. Yang, C S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C, and Schantz, S. P. (1998). Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7:* 351–354.
71. Yang, C. S., Maliakal, P. and Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42:* 25–54.
72. Zhang, J., Jiang, S. and Watson, R. R. (2001). Antioxidant supplementation prevents oxidation and inflammatory responses induced by sidestream cigarette smoke in old mice. *Env. Health Perspect. 109:* 1007–1009.

Часть III

ПИЩЕВЫЕ СИСТЕМЫ

13. Дисперсные системы

Петер Вальстра (*Pieter Walstra*), Тон ван Флиет (*Ton van Vliet*)
Перевод В. Д. Широкова под науч. ред. д-ра техн. наук, проф. А. А. Кочетковой

Содержание

13.1. Введение... 722
13.1.1. Пищевые продукты как дисперсные системы 722
13.1.2. Представление дисперсий 723
13.1.3. Влияние на скорости реакций 726
13.2. Поверхностные явления 726
13.2.1. Поверхностное натяжение и адсорбция..... 727
13.2.2. Поверхностно-активные вещества . 728
13.2.2.1. Амфифильные вещества . 728
13.2.2.2. Полимеры 730
13.2.3. Краевые углы 731
13.2.4. Криволинейные поверхности раздела фаз.. 732
13.2.5. Реологические свойства на межфазных границах 734
13.2.6. Градиенты поверхностного натяжения..... 735
13.2.7. Функции ПАВ..... 736
13.3. Коллоидные взаимодействия..... 736
13.3.1. Ван-дер-Ваальсовы силы притяжения..... 737
13.3.2. Электрические бислои 737
13.3.3. Теория ДЛФО 738
13.3.4. Силы стерического отталкивания. 739
13.3.5. Деплетивное взаимодействие.. 740
13.3.6. Прочие аспекты 740
13.4. Жидкие дисперсии... 741
13.4.1. Общие вопросы 741
13.4.2. Седиментация..... 742
13.4.3. Агрегация..... 743
13.5. «Полутвердые» продукты 744
13.5.1. Гели... 745
13.5.1.1. Структура гелей..... 745
13.5.1.2. Реологические характеристики 746
13.5.1.3. Модуль 747
13.5.1.4. Полимерные гели..... 748
13.5.1.5. Гели из частиц 748
13.5.2. Функциональные свойства гелей 750
13.5.3. Некоторые пищевые гели..... 752
13.5.3.1. Полисахариды..... 752
13.5.3.2. Желатин .. 754
13.5.3.3. Казеиновые гели... 754
13.5.3.4. Гели из глобулярных белков . 755
13.5.3.5. Смешанные гели... 756
13.5.4. «Ощущение во рту» 756
13.6. Эмульсии 758
13.6.1. Описание..... 758

13.6.2. Образование эмульсии 759
13.6.3. Типы нестабильности эмульсий 762
13.6.4. Коалесценция. 764
13.6.5. Частичная коалесценция 767
13.7. Пены. 769
13.7.1. Пенообразование. Краткие сведения. 770
13.7.1.1. Перенасыщение 770
13.7.1.2. Применение механических воздействий 770
13.7.1.3. Изменение структуры пены 771
13.7.2. Нестабильность пен. 772
13.7.2.1. Созревание Оствальда. 773
13.7.2.2. Дренирование 774
13.7.2.3. Коалесценция 774
Использованные обозначения 776
Дополнительная литература 777
Литература 777

13.1. Введение

Темы, рассматриваемые в данной главе, значительно отличаются от основного материала этой книги в том смысле, что в них почти не затрагивается как таковая химия, то есть реакции, включающие передачу электронов. Вместе с тем, для понимания свойств и производства большинства пищевых продуктов, особенно переработанных, важны многие аспекты дисперсных систем.

Мы попытались свести к минимуму рассмотрение теоретических положений, поскольку большинство из них подробно изложено в книге «Физическая химия пищевых продуктов» (*Physical Chemistry of Foods,* см. раздел «Дополнительная литература»).

13.1.1. Пищевые продукты как дисперсные системы

Большинство пищевых продуктов представляет собой дисперсные системы. Только некоторые из них, например, кулинарный жир и отдельные напитки, являются гомогенными растворами, но даже пиво при розливе имеет слой пены. Свойства дисперсной системы определяются не только ее химическим составом — они также зависят от физической структуры, которая может быть очень сложной, как например, в случае пищевых продуктов из растительного или животного сырья (см. главы 16 и 17). Переработанные пищевые продукты, как и некоторые натуральные, могут иметь более простую структуру: пивная пена — это раствор, содержащий пузырьки газа, молоко — это раствор, содержащий капельки жира и белковые агрегаты (мицеллы казеина), пластичные жиры состоят из жидких масел и агрегированных кристаллов триацилглицеринов, салатные заправки (дрессинги) могут быть только эмульсией, а некоторые гели состоят из сети молекул полисахаридов, которые иммобилизируют раствор. Однако целый ряд переработанных продуктов имеют более сложную структуру, поскольку включают в себя несколько структурных элементов различных размеров и агрегатных состояний: желированные начинки, вспененные желе, продукты, получаемые взбиванием или центрифугированием, пудры, маргарины, тесто, хлеб, и т. д.

Наличие дисперсного состояния имеет целый ряд особенностей.

Поскольку различные компоненты продукта пространственно разделены, отсутствует термодинамическое равновесие. Более того, даже гомогенные продукты могут находиться в неравновесном состоянии, причем для дисперсных систем этот аспект гораздо более важен и может иметь существенное влияние на химические реакции, что вкратце рассматривается в разделе 13.1.3.

Вкусоароматические соединения могут находиться в составе различных компонентов, что замедляет их высвобождение при потреблении продукта. Более того, такая дисперсность вкусоароматических веществ зачастую может приводить к флуктуациям в высвобождении этих соединений при по-

треблении продукта, тем самым усиливая вкус, так как преодолевается привыкание органов чувств к вкусоароматическим соединениям. Большинство подобных «компартментированных» пищевых продуктов характеризуется вкусом, существенно отличающимся от вкуса того же продукта, гомогенизированного перед потреблением.

Если, как это часто бывает, между структурными компонентами дисперсной системы действуют силы притяжения, то система приобретает определенную консистенцию, что означает термодинамическую устойчивость. Это довольно важное функциональное свойство, поскольку оно относится к таким характеристикам, как сохранение формы, легкость намазывания или простота нарезки. Более того, консистенция, равно как и любая другая физическая неоднородность пищевого продукта, влияет на такой органолептический показатель, как «ощущение во рту». Ученые-пищевики зачастую объединяют эти свойства в понятие «текстура».

Если консистенция продукта является достаточно прочной, то подвижность любого присутствующего в нем растворителя (в большинстве пищевых продуктов это вода) будет недостаточной для объемной текучести, из-за чего массоперенос (и, как правило, теплоперенос) должен обеспечиваться диффузией, а не конвекцией. Это оказывает значительное влияние на скорость реакций.

Дисперсное состояние существенно влияет на внешний вид пищевой системы из-за рассеивания света структурными элементами, размер которых превышает примерно 50 нм. Крупные видимые включения и неоднородности и обусловливают словарное значение термина «текстура».

- Так как дисперсная система в микроскопическом масштабе физически неоднородна, она может быть физически нестабильной. В ходе хранения в ней могут происходить изменения различного рода, воспринимаемые как формирование «макроскопической неоднородности», например, расслаивание. Кроме того, дисперсное состояние может меняться при обработке или потреблении, что может быть желательным (например, при взбивании сливок) или нежелательными (например, при чрезмерном взбивании сливок, приводящем к образованию кусочков масла).

Некоторые из вышеупомянутых аспектов и рассматриваются в этой главе. Мы практически не будем касаться «макроскопических» механических свойств, а также гидродинамических и технологических аспектов. Конечно, многие пищевые продукты демонстрируют весьма специфическое поведение, но подробное их рассмотрение заняло бы много места с малой пользой для общего понимания, и поэтому основное внимание мы уделим некоторым общим аспектам довольно простых модельных дисперсий.

13.1.2. Представление дисперсий

Дисперсия — это гетерогенная система мелкораздробленных частиц дисперсной фазы, распределенных в однородной непрерывной фазе (дисперсионной среде). Если частицы находятся в газообразном состоянии, мы говорим о пене, в случае жидких частиц — об эмульсии, а в случае твердых частиц — о суспензии (например, апельсиновый сок с мякотью). Эмульсии могут быть двух типов: «масло-в-воде (М/В) и «вода-в-масле» (В/М). Большинство пищевых эмульсий относятся к первому типу (молоко, дрессинги, многие супы) и могут разбавляться водой. Дисперсии могут содержать целый ряд различных частиц: например, молоко содержит небольшие белковые агрегаты, а в супах зачастую присутствуют кусочки растительных волокон. В сливочном масле и маргарине содержатся капли воды, но они не являются истинными эмульсиями типа «вода-в-масле», поскольку масло содержит кристаллы жира, которые образуют пространственную структурную сетку.

Сливочное масло и маргарин являются примером твердой дисперсии, то есть системы, в которой сплошная масса после получения дисперсии приобретает свойства твердого тела. Во взбитом (пенообразном) омлете сплошной белковый раствор образует гель. Дисперсией твердых частиц (кристаллов сахара, частиц измельченных какао-бобов) в масле является жидкий шоколад, в котором масло после охлаждения почти полностью превращается в кристаллическую жировую сетку (каркас).

Если двухкомпонентная система подобна твердому телу, то в принципе в ней могут быть две сплошные «фазы». Показательным примером может служить влажная губка, в которой сплошные фазы — это и твердый матрикс, и вода. Такими системами с двумя сплошными фазами являются и некоторые пищевые продукты: например, в хлебе сплошными фазами являются и газовая фаза, и твердый каркас. В против-

ном случае хлеб после выпечки терял бы большую часть своего объема, поскольку при охлаждении поры с горячим газом существенно сжимались бы, так как в основном в них содержится водяной пар.

Коллоиды обычно определяют как дисперсии с частицами, размеры которых больше молекул истинных растворов (например, молекул растворителя), но все же слишком малы, чтобы быть видимыми. Это подразумевает размерный диапазон частиц примерно от 10 нм до 0,1 мм. Как правило, различают два типа коллоидов: лиофильные («любящие растворитель») и лиофобные («не любящие растворитель»). Последние состоят из двух или более фаз, таких как воздух, масло, вода или различные кристаллические вещества, и самопроизвольно не образуются. Для диспергирования одной фазы в другой (сплошной) фазе требуются затраты энергии, а образующаяся система находится в неравновесном состоянии и, следовательно, физически нестабильна.

Лиофильные коллоиды образуются при «растворении» вещества в соответствующем растворителе, и в таком случае система находится в равновесии. Основными примерами являются макромолекулы (полисахариды, белки и т. д.) и ассоциированные коллоиды. Последние образуются из амфифильных молекул, например, мыла, у которых довольно длинный гидрофобный «хвост» и более короткая полярная (то есть гидрофильная) «голова». В водной среде такие молекулы имеют тенденцию ассоциироваться так, что «хвосты» тесно сближаются друг с другом, а «головы» контактируют с водой. Таким способом образуются мицеллы и жидкокристаллические структуры. Мицеллы вкратце рассматриваются в разделе 13.2.2, а жидкокристаллические фазы [36] для пищевых продуктов большого значения не имеют.

Следует отметить, что нестабильные системы могут существовать длительное время (то есть не проявлять существенного изменения свойств в обозримом времени). Это означает, что скорость изменений очень мала, что зачастую обусловлено высокой энергией активации для осуществления химической реакции или физического изменения или очень низкой подвижностью молекул или частиц из-за очень высокой вязкости системы (например, в сушеных продуктах).

Диапазон размера структурных элементов в пищевых продуктах необыкновенно широк и достигает шести порядков (рис. 13.1). Диаметр молекулы воды составляет около 0,3 нм, тогда как типичная клетка растительных или животных тканей достигает порядка 0,3 мм. Важны также форма частиц и их объемная доля ϕ (то есть часть объема дисперсной системы, приходящаяся на долю частиц дисперсной фазы).

Все эти переменные влияют на свойства продукта. Ниже приведены некоторые эффекты, связанные с этим влиянием.

1. *Внешний вид.* Эмульсия типа «масло-в-воде» получается почти прозрачной, если диаметр жировых глобул составляет 0,03 мкм, бело-голубой, если этот диаметр 0,3 мкм, и белой, если диаметр 3 мкм. При диаметре жировых глобул 30 мкм становится заметен цвет масла (обычно желтый).

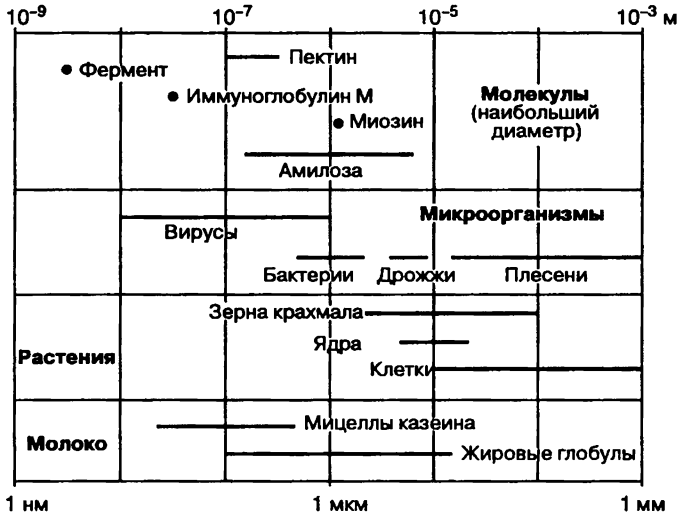


Рис. 13.1. Примерные размеры некоторых структурных элементов пищевых продуктов

2. *Площадь поверхности.* Для совокупности одинаковых сферических частиц диаметром d (м) удельная площадь поверхности A (м^2/м^3) составляет:

$$A = 6\frac{\phi}{d}, [\text{м}^2/\text{м}^3], \tag{13.1}$$

то есть площадь поверхности может быть довольно большой. Для эмульсии с $\phi = 0{,}1$ и $d = 0{,}3$ мкм $A =$ 2 м^2/мл эмульсии. Если 5 мг белка адсорбируются на 1 м^2 поверхности жировых глобул, то адсорбированный белок будет составлять 1% эмульсии.

3. *Размер пор.* Между частицами существуют области дисперсионной среды, размер которых пропорционален размеру частиц (чем больше ϕ, тем он меньше). Если дисперсная фаза образует пространственную структурную сетку, то поры в этой сетке подчиняются тем же правилам. Проницаемость (то есть легкость, с которой растворитель может проникать через поры) пропорциональна квадрату размера пор, и поэтому полимерный гель обладает значительно меньшей проницаемостью, чем гель, образованный из сравнительно крупных частиц (см. раздел 13.5.2).
4. *Диапазон времени.* (Примечание: временная шкала определяется как время, необходимое для совершения конкретного события, например, для реакции двух молекул, вращения частицы, выпечки хлеба и т. п.) Чем крупнее частицы, тем более протяженной является временная шкала. Зависимость от времени (t) среднеквадратичного значения диффузионного расстояния (z) частицы диаметром d имеет следующий вид:

$$\left(z^2\right)^{0,5} \propto \left(\frac{1}{d}\right)^{0,5} \tag{13.2}$$

В воде частица диаметром 10 нм диффундирует на расстояние, равное ее диаметру, примерно за 1 мкс, частица диаметром 1 мкм — за 1 с, а частица диаметром 0,1 мм — за 12 дней. Учитывая диффузию вещества в некоторый структурный элемент, зависимость между коэффициентом диффузии D, расстоянием l и временем $t_{0,5}$, необходимым для уменьшения разности концентраций в два раза, имеет следующий вид:

$$l^2 \approx Dt_{0,5}. \tag{13.3}$$

Коэффициент диффузии D небольших молекул в воде составляет $\approx 10^{-9}$ м^2/с, и в большинстве случаев (более крупные молекулы, более вязкий раствор) он еще меньше.

5. *Воздействие внешних сил.* Большинство внешних сил, воздействующих на частицы, пропорциональны квадрату диаметра частицы, тогда как большинство сил взаимодействия коллоидных частиц пропорциональны их диаметру. Это означает, что небольшие частицы практически невосприимчивы к внешним воздействиям, таким как напряжение сдвига или сила тяжести. Крупные частицы часто способны деформироваться или даже разрушаться под воздействием внешних сил. Крупные частицы также намного быстрее осаждаются.
6. *Легкость разделения.* Из некоторых приведенных выше пунктов следует, что мелкие частицы значительно труднее отделить от жидкости, чем крупные.

Частицы одного размера встречаются крайне редко. Вопросы распределения частиц по размеру являются предметом отдельного обсуждения и в данной главе не рассматриваются (см. работы [2, 66]). Достаточно сказать, что для распределения частиц по размеру обычно используется диапазон их размеров и что типичным значением для распределения является средний диаметр частиц по Заутеру (d_{32}) или среднее соотношение объема частиц к их поверхности (d_{vs}). Тем не менее, разные свойства могут требовать использования различных типов средних значений. Чем шире распределение размеров (его диапазон определятся как среднеквадратичное отклонение, деленное на среднее), тем больше разница между разными типами средних значений, причем разница на порядок не является чем-то исключительным. Довольно часто точно определить распределение размеров очень сложно [2]. Сложности с определением и интерпретациями еще более возрастают для анизомерных частиц, то есть частиц с различными свойствами.

13.1.3. Влияние на скорости реакций

Как мы уже отмечали, компоненты дисперсного пищевого продукта могут быть пространственно разделены, что может оказывать значительное влияние на скорости реакций. В системе с водной (α) и жировой (β) фазами некий компонент может быть растворим в обеих фазах. В этом случае согласно распределению Нернста, или закону разделения, отношение концентраций (c) в обеих фазах постоянно:

$$\frac{c_\alpha}{c_\beta} = \text{const.} \tag{13.4}$$

Эта константа зависит от температуры и, возможно, других условий. Например, значение pH сильно влияет на распределение карбоновых кислот, так как эти кислоты жирорастворимы только в нейтрализованном состоянии. При высоких значениях pH они полностью ионизируются, и почти вся кислота будет находиться в водной фазе, а при низких pH весьма значительной может быть ее концентрация в жировой фазе. Необходимо заметить, что количество реагента в фазе также зависит от объемной доли этой фазы.

Когда реакция происходит в одной из присутствующих фаз, скорость реакции зависит не от общей концентрации реагента, а от его концентрации именно в данной фазе [93], которая может быть выше или ниже общей концентрации в зависимости от величины константы распределения (уравнение 13.4). Так как в пищевых продуктах многие реакции представляют собой последовательности нескольких различных реакций, то характер суммарной реакции, а значит, и смесь образующихся компонентов могут также зависеть от распределения компонентов. Химические реакции часто сопровождаются переходом молекул между средами, и будут зависеть от расстояния и подвижности молекул. Из уравнения (13.3) следует, что время диффузии для перехода внутрь довольно мелких структурных элементов (например, в капли эмульсии) или из них обычно очень мало. Однако если растворитель иммобилизирован в матрице структурных элементов, это может значительно замедлить скорость реакции, особенно если реагенты (например, молекулярный кислород) должны диффундировать извне. Кроме того, некоторые реакции возникают, главным образом, на границе фаз. Примером может служить самоокисление липидов, где окисляющееся вещество (ненасыщенный жир) находится в жировых глобулах, а катализатор, скажем, ионы меди, в водной фазе. Другим примером может быть воздействие фермента, находящегося в одном структурном элементе, на компонент другого структурного элемента. В таких случаях удельная поверхность раздела определяет скорость реакции. Адсорбция реагирующих веществ на границах раздела между структурными элементами может снижать их действующие концентрации и тем самым реакционную способность. Таким образом, в дисперсной системе скорость химических реакций и смесь продуктов реакций могут быть совершенно иными, чем в гомогенной системе. Примеры с растительными и животными тканями хорошо известны, однако другие случаи детально не изучались (за исключением активности некоторых добавок [93] и ферментативного липолиза жира в каплях эмульсии).

13.2. Поверхностные явления

Как мы уже отмечали, подавляющее большинство пищевых продуктов характеризуются большой поверхностью раздела фаз или межфазной границей. Зачастую вещества адсорбируются на поверхности раздела фаз, что оказывает большое влияние на статические и динамические свойства системы. В этом разделе мы рассмотрим основные аспекты поверхностных явлений, а области их применения мы затронем далее (см. также работы [1, 3]).

Между двумя фазами могут существовать различные типы поверхностей раздела, основными из которых являются «газ–твердое вещество», «газ–жидкость», «жидкость–твердое вещество» и «жидкость–жидкость». Если одной из фаз является газ (чаще всего воздух), то обычно говорят о поверхности раздела фаз, тогда как в других случаях — о границе раздела фаз, но чаще всего эти термины взаимозаменяемы и используются как синонимы. Более важно различие между твердой поверхностью раздела, когда одна из фаз — твердое вещество, и жидкой поверхностью раздела между газом и жидкостью или между двумя жидкостями. Если твердая поверхность раздела является «жесткой», то жидкая поверхность раздела может деформироваться.

13.2.1. Поверхностное натяжение и адсорбция

На границе раздела между двумя фазами имеется избыток свободной энергии, пропорциональный площади поверхности раздела. Следовательно, чтобы ее минимизировать, граница раздела стремится стать как можно меньше, а это означает, что для увеличения поверхности раздела необходимо приложить внешнюю силу. Реакционной силой на границе раздела является сила притяжения, действующая в плоскости границы раздела. Если поверхность раздела жидкая, то эту силу можно измерить (рис. 13.2, *a*); силу, приходящуюся на единицу длины, называют *поверхностным* или *межфазным натяжением* (γ, н/м — γ_{OW} обозначает поверхностное натяжение между маслом и водой, γ_{AS} — между воздухом и твердым телом и т. д.). Поверхностное натяжение имеется и у твердого тела, но его нельзя измерить.

Величина γ зависит от состава двух фаз (некоторые примеры приведены в табл. 13.1). Поверхностное натяжение зависит также от температуры и почти всегда понижается с ее повышением.

В растворе некоторые молекулы, соприкасающиеся с поверхностью раздела фаз, могут аккумулироваться на этой поверхности, образуя мономолекулярный слой. Данное явление называется *адсорбцией*, причем адсорбцию следует отличать от абсорбции, при которой вещество проникает в материал. Адсорбирующееся вещество называют *поверхностно-активным веществом* (ПАВ). Оно адсорбируется потому, что это приводит к снижению свободной энергии поверхности и, следовательно, к снижению поверхностного натяжения (рис. 13.3, *a*). Из приведенных графиков видно, что снижение значения γ зависит от остаточной концентрации ПАВ в растворе после достижения состояния равновесия. Чем ниже значение c_{eq}, при котором получено данное снижение γ, тем выше *поверхностная активность* данного ПАВ.

Важная переменная — *коэффициент адсорбции (или удельная адсорбция) растворенного вещества* Γ, то есть количество (в молях или в массовых долях) адсорбированного вещества (адсорбата) на единицу поверхности адсорбента. Для $\Gamma = 0$ $\gamma = \gamma_0$ (значение для чистой поверхности раздела). При относительно высокой концентрации ПАВ (c_{eq}) величина Γ достигает предельного значения, соответствующего полному насыщению поверхности молекулами поверхностно-активного вещества и образованию мономолекулярного слоя. Плато Γ соответствует концентрации ПАВ, при которой γ достигает постоянного значения. Величина $\Gamma_{плато}$ для разных ПАВ варьирует, в основном, между 1 и 4 мг/м^2. Зависимость коэффициента адсорбции от равновесной концентрации ПАВ называют *изотермой адсорбции*. Вещества в газовой фазе (например, вода в воздухе) также могут адсорбироваться на (твердой) поверхности, и для них характерна та же зависимость.

Для каждого ПАВ в равновесном состоянии (и при заданной температуре) существует некоторое постоянное соотношение между величиной Γ и снижением γ, называемое поверхностным давлением или *поверхностной ак-*

Таблица 13.1
Некоторые значения сил межфазного натяжения, мН/м*

Вещество	По отношению к воздуху	По отношению к воде
Вода	72	0
Насыщенный раствор NaCl	82	0
0,02 М раствор *SDS* в воде	41	0
Этанол	22	0
Керосин	30	50[a]
Триацилглицериновый жир	35	30
Ртуть	486	415

*Значения аппроксимированы к комнатной температуре

[a] У некоторых буферных растворов межфазное натяжение ниже, чем у воды.

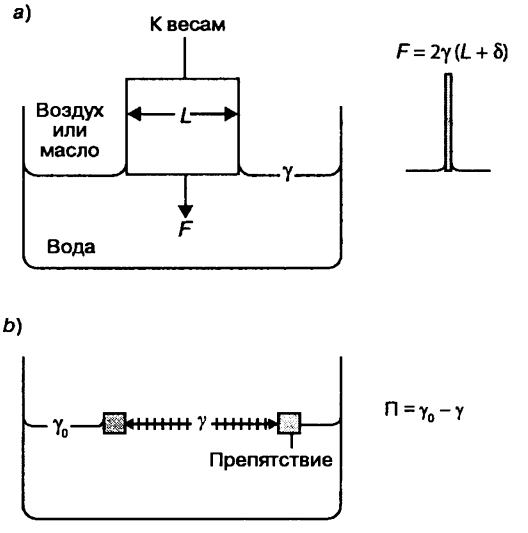


Рис 13.2. (*a*) Измерение поверхностного натяжения с помощью пластины Вилхельми (*Wilhelmy*) (*L* — ширина, Δ — толщина). Пластина соединена с чувствительными весами; *F* — результирующая сила; (*b*) Иллюстрация поверхностного давления (П), создаваемого адсорбированными молекулами поверхностно-активного вещества (вертикальные черточки). Между препятствиями поверхностное натяжение снижается, и на препятствия действует результирующее двухмерное давление величиной П

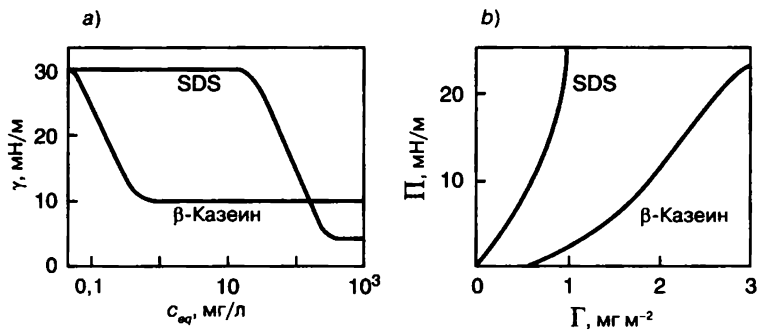


Рис. 13.3. Абсорбция β-казеина и *SDS (додецилсульфата натрия)* на поверхности раздела фаз «масло–вода»: *a*) Межфазное натяжение (γ) как функция равновесной концентрации ПАВ (c_{eq}); *b*) Зависимость между поверхностным давлением (П) и поверхностной нагрузкой (Г) (приближенные значения). По Walstra P. et al. *Dairy Science and Technology.* CRC/Taylor & Francis, 2006

тивностью П, которое равно $\gamma_0 - \gamma$ (рис. 13.2 *b*). Максимальное значение П у некоторых ПАВ варьирует, но для многих ПАВ (хотя и не для всех) оно примерно одинаково для поверхностей раздела «воздух–вода» и «масло-вода». Зависимость между П и Г называется *уравнением состояния поверхности* (рис. 13.3, *b*).

Скорость адсорбции некоего ПАВ зависит, в основном, от его концентрации. ПАВ часто переносится к поверхности диффузией. Если его концентрация равна c, а Γ — это удельная адсорбция, то поверхностный слой толщиной Γ/c будет достаточным для обеспечения нужного количества ПАВ. По уравнению (13.3), принимая $l = \Gamma/c$ получается

$$t_{0,5} = \Gamma^2/Dc^2. \qquad (13.5)$$

В водных растворах D, как правило, составляет около 10^{-10} м²/с. Если концентрация ПАВ составляет 3 кг/м³, а $\Gamma = 3$ мг/м², то $t_{0,5} \approx 10$ мс. Время полной адсорбции составит $10 \times t_{0,5}$, то есть значительно меньше 1 с. При более низкой концентрации ПАВ адсорбция займет значительно больше времени, однако скорость адсорбции можно заметно увеличить с помощью перемешивания. Другими словами, на практике адсорбция почти всегда происходит быстро.

13.2.2. Поверхностно-активные вещества

Поверхностно-активные вещества делят на два основных типа: полимеры и небольшие амфифильные молекулы (некоторые авторы используют термин «сурфактант» (ПАВ) только для низкомолекулярных амфифилов; кроме того, поверхностно-активные вещества часто называют эмульгаторами).

13.2.2.1. Амфифильные вещества

Гидрофобная (липофильная) часть низкомолекулярного амфифильного вещества (амфифила) — это обычно алифатическая цепь. Гидрофильные части очень разнообразны. В классическом ПАВ (обычном мыле) — это ионизированная карбоксильная группа. Большинство амфифильных веществ не очень хорошо растворяется в воде или в масле, и поэтому у них отталкивающее взаимодействие с этими растворителями минимально тогда, когда они частично находятся в гидрофильной среде (воде), а частично — в гидрофобной (масле), то есть на поверхности раздела М/В (рис. 13.4). Кроме того, они адсорбируются на поверхности раздела «воздух–вода» и на некоторых поверхностях раздела «твердое тело–вода». В растворе амфифильные вещества имеют тенденцию к ассоциированию и образованию мицелл, что помогает минимизировать силы отталкивания с молекулами растворителя.

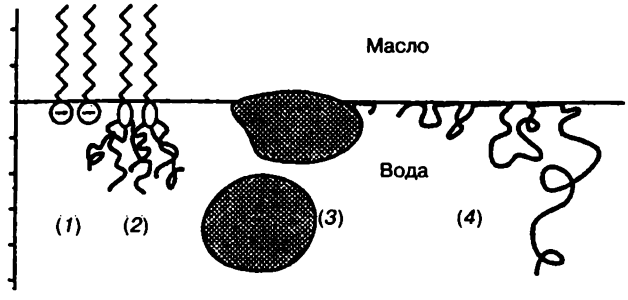


Рис. 13.4. Схематичное представление способов абсорбции некоторых ПАВ на поверхности раздела «масло–вода» (слева шкала в нм): *1* — мыло; *2* — Твин; *3* — небольшой глобулярный белок (для сравнения показана молекула в растворе); *4* — β-казеин. По Walstra P. et al. *Dairy Science and Technology.* CRC/Taylor & Francis, 2006

Некоторые низкомолекулярные ПАВ, имеющие наиболее важное значение для пищевой промыш-

мышленности, приведены в табл. 13.2 [35, 60]. В зависимости от типа гидрофильной части они подразделяются на неионногенные, анионактивные и катионактивные. Кроме того, различают натуральные ПАВ (мыло, моноацилглицерины, фосфолипиды) и синтетические. Примером синтетических являются так называемые «Твины», отличительная особенность которых состоит в том, что в их гидрофильной части присутствуют три или четыре полиоксиэтиленовые цепи длиной около пяти мономеров. Фосфолипиды представлены широким спектром соединений, отличающихся по составу и свойствам, причем некоторые из них являются цвиттер-ионными.

Таблица 13.2
Некоторые низкомолекулярные ПАВ и их значения ГЛБ

Тип	Пример ПАВ	Значение ГЛБ
Неионногенные:		
алифатический спирт	Гексадеканол	1
моноацилглицерин	Глицерина моностеарат	3,8
эфиры моноацилглицеринов	Лактоила монопальмитат	8
СПЭНы	Сорбитана моностеарат	4,7
	Сорбитана моноолеат	7
	Сорбитана монолаурат	8,6
Твин 80	Полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат	16
Анионактивные:		
мыло	Олеат натрия	18
эфиры молочной кислоты	Натрия стеароил-2-лактоиллактат	21
фосфолипиды	Лецитин (цвиттер-ионный)	Довольно большое
типол [а]	*SDS* (додецилсульфат натрия)	40
Катионактивные [а]		Большое

[а] Не используются в пищевых продуктах; применяются только как моющие средства.

Важной характеристикой низкомолекулярных ПАВ является значение *гидрофильно-липофильного баланса* (ГЛБ). У вещества с почти одинаковой растворимостью в воде и масле значение ГЛБ равно 7. Меньшие значения ГЛБ означают большую растворимость ПАВ в масле и наоборот. Значения ГЛБ ПАВ находятся в диапазоне примерно от 1 до 40. Сама по себе зависимость между ГЛБ и растворимостью имеет самостоятельное значение, но она также является характеристикой ПАВ как эмульгатора: ПАВ с ГЛБ > 7 обычно пригодны для приготовления пен и эмульсий типа «масло-в-воде», а ПАВ с ГЛБ < 7 — для эмульсий типа «вода-в-масле» (о правиле Банкрофта см. раздел 13.6.2). ПАВы, которые используются как моющие средства, в водном растворе имеют большие значения ГЛБ. Большинство других декларируемых взаимосвязей свойств ПАВ со значениями ГЛБ остаются дискуссионными.

Первоначально значение ГЛБ некоего ПАВ определялось как отношение его растворимости в воде к его растворимости в масле. В настоящее время значения ГЛБ получены для разных химических групп. Некоторые авторы (например, в работе [27]) приводят табличные значения. Полярные группы ПАВ имеют положительное значение, а гидрофобные — отрицательное. Сумма этих значений плюс 7 дает значение ГЛБ. Более длинная алифатическая цепь дает более низкое значение ГЛБ, а более полярная или большая полярная группа — более высокое его значение. На самом деле значение ГЛБ некоего ПАВ зависит от температуры и от типа масла.

Как отмечалось выше, многие низкомолекулярные амфифилы склонны к мицеллообразованию при концентрации выше так называемой *критической концентрации мицеллобразования* (ККМ). При превышении ККМ в мицеллы входят дополнительные молекулы ПАВ и их термодинамическая активность (или условно говоря, эффективная концентрация) почти не возрастает. Следовательно, поверхностная активность Γ больше не увеличивается, и значение γ не снижается. ККМ додецилсульфата натрия (*SDS*) достигается при общей концентрации около 300 мг/л (рис. 13.3, *а*). В гомологическом ряду ПАВ более длинная цепь приводит к меньшему значению ККМ. Для ионных ПАВ с увеличением ионной силы ККМ заметно уменьшается. Кроме того, ККМ может зависеть и от значения pH.

На поверхности раздела фаз «воздух–вода» наблюдается аналогичная картина, но поскольку γ_0 имеет большее значение, а П — примерно ту же величину, значение γ оказывается существенно больше. Наименьшее значение γ, полученное на поверхности раздела «воздух–вода», составляет около 35 мН/м, тогда как на поверхности раздела фаз «триацилглицерин (масло)-вода» оно варьирует для большинства низкомолекулярных ПАВ от значения менее 1 до 5 мН/м.

Следует иметь в виду, что промышленные ПАВ обычно представляют собой смеси из нескольких компонентов, имеющих разную длину цепи и, возможно, различные свойства. Эти компоненты могут иметь, например, разные плато-значения γ. Кроме того, могут присутствовать некоторые микрокомпоненты, дающие более низкое значение γ по сравнению с основными компонентами. При этом в состоянии равновесия на поверхности раздела фаз будут преобладать ПАВ, дающие наименьшее значение γ. Вместе с тем, их диффузия к границе раздела фаз из-за меньшей концентрации будет медленной (уравнение 13.5), то есть для достижения равновесного состояния и, следовательно, стабильного значения γ требуется много времени. Еще одна сложность связана с тем, что в реальных дисперсиях отношение площади поверхности к объему очень велико, тогда как в ситуациях, в которых γ обычно измеряется (то есть при макроскопической границе раздела фаз), данное отношение весьма мало. Это означает, что для фактических значений в пене или эмульсии результат таких измерений γ может оказаться нерепрезентативным.

13.2.2.2. Полимеры

В качестве ПАВ могут использоваться некоторые синтетические полимеры, эффективность которых подтверждается значительным числом экспериментальных и теоретических данных [26]. Для этой цели подходят сополимеры, у которых отдельные части молекул достаточно гидрофобны, а другие — гидрофильны. Такие вещества имеют тенденцию адсорбироваться с образованием «цепочек», «петель» и «хвостов» (рис. 13.4, кривая *4*). Таким же способом адсорбируются некоторые природные полимеры. Поверхностная активность полисахаридов до настоящего времени остается предметом дискуссии. Большинство поверхностно-активных полисахаридов имеет в своем составе белковую часть, которая и отвечает за это свойство [20]. С другой стороны, путем химической модификации можно получить полисахариды с гидрофобными группами (примером могут служить некоторые простые эфиры целлюлозы, использующиеся как эмульгаторы) [13].

В пищевых технологиях часто наиболее предпочтительными ПАВ оказываются *белки*, особенно для пен и эмульсий типа «масло-в-воде» [18, 53, 87] (из-за нерастворимости в маслах для эмульсий типа «вода-в-масле» они не пригодны). Способ адсорбции белков может быть разным (см. рис. 13.4). Их конформация всегда (и зачастую значительно) меняется. Например, в результате конформационного изменения большинство ферментов (за исключением истинных липаз) после адсорбции на поверхности раздела «масло–вода» полностью теряет свою активность; некоторые ферменты после адсорбции на поверхности раздела фаз «воздух–вода» свою активность частично сохраняют [16]. Большинство глобулярных белков на поверхностях раздела фаз, по-видимому, сохраняет глобулярную конформацию, которая, однако, отличается от нативной. Адсорбция белков с небольшой вторичной структурой (например, желатина и казеина) зачастую очень сходна с адсорбцией линейных полимеров. Это означает, что они намного дальше выступают в водную фазу, чем большинство глобулярных белков. Последние перед абсорбцией могут денатурироваться (например, при тепловой обработке), что приводит к изменению их конформации после адсорбции (как правило, значение Г и размер выступа увеличиваются). При высокой объемной концентрации белка может произойти многослойная адсорбция, однако второй и последующие более удаленные слои адсорбируются весьма слабо.

При сравнении адсорбции белкового и анионного ПАВ можно отметить три основных отличия белков и синтетических высокомолекулярных полимеров от низкомолекулярных амфифильных веществ (см. рис. 13.3).

Поверхностная активность белка явно больше, чем анионного ПАВ. Следовательно, невозможно (или почти невозможно) достигнуть десорбции адсорбированных белков разбавлением или «промывкой». Затруднения десорбции увеличиваются из-за реакции перекрестной сшивки между адсорбированными белковыми молекулами, что, в частности, показано для белков со свободной тиольной группой. В этом случае на поверхности раздела фаз может иметь место взаимный обмен «цистеин–цистин» [24].

Уравнения поверхностного состояния для белка и для SDS существенно различаются (рис. 13.3, *b*). У белка значение Г, при котором наблюдается значительное поверхностное давление, намного больше, чем у амфифильного вещества. Это объясняется тем, что при низких значениях Г величина П пропорциональна поверхностной нагрузке, выраженной в молях ПАВ на единицу площади поверхности раздела, но молярная масса типичного белка примерно в 100 раз больше, чем у типичного амфифила. Это имеет некоторые важные последствия для приготовления эмульсий и пен (см. разделы 13.6.2 и 13.7.1). Анионное ПАВ при плато-адсорбции дает более низкое межфазное натяжение, чем белок. Величина межфазного натяжения влияет на некоторые явления, которые мы рассмотрим далее, здесь же отметим лишь один аспект, а именно вытеснение белка с поверхности раздела фаз амфифилом, присутствующим в высокой концентрации [15] (рис. 13.5). Во многих пищевых продуктах нативно присутствуют некоторые ПАВ (жирные кислоты, моноацилглицерины и фосфолипиды), способные изменять свойства адсорбционных слоев.

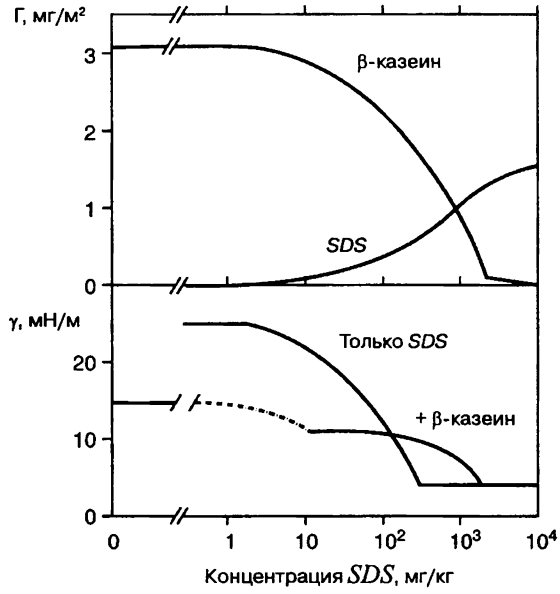


Рис. 13.5. Удельная адсорбция (Г) в эмульсии типа «масло-в-воде» и поверхностное натяжение (γ) на поверхности раздела фаз «масло–вода» для β-казеина в присутствии возрастающей концентрации *SDS*; приведены также значения γ для *SDS* без β-казеина. По [87]

До некоторой степени белки могут также замещать друг друга в поверхностном слое в зависимости от концентрации, поверхностной активности, молярной массы, молекулярной гибкости и т. д. Хотя адсорбция белков кажется необратимой (в том смысле, что обычно невозможно существенно понизить Г за счет разбавления системы), взаимное вытеснение подразумевает, что отдельные белковые молекулы в межфазном слое могут заменяться, хотя и медленно, белковыми молекулами из раствора.

13.2.3. Краевые углы

При соприкосновении двух подвижных (текучих) сред с твердой поверхностью и друг с другом возникает межфазная граница между этими тремя фазами [1]. Пример для системы «воздух–вода–твердое вещество» приведен на рис. 13.6, *a*.

Между поверхностными силами, действующими в плоскости поверхности твердой фазы, должно существовать равновесие, которое описывается уравнением Юнга (*Young*)

$$\gamma_{AS} = \gamma_{WS} + \gamma_{AW}\cos\theta. \qquad (13.6)$$

Краевой угол θ традиционно берется к текучей фазе с большей плотностью. Его значение зависит от трех поверхностных натяжений. Значения γ_{AS} и γ_{WS} измерить нельзя, но их разницу можно получить из краевого угла смачивания. Если $(\gamma_{AS} - \gamma_{WS})/\gamma_{AW} > 1$, уравнение (13.6) решения не имеет, θ = 0, и твердое вещество будет полностью смочено жидкостью (примером может служить вода на чистом стекле). Если это частное меньше −1, то смачивания не происходит (примером служит вода на тефлоне или других сильно гидрофобных материалах).

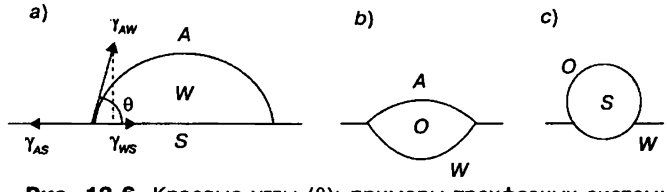


Рис. 13.6. Краевые углы (θ): примеры трехфазных систем: *A* — воздух; *O* — масло; *S* — твердое вещество; *W* — вода. Стрелки показывают относительные значения трех межфазных натяжений. По Walstra P. et al. *Dairy Science and Technology*. CRC/Taylor & Francis, 2006

Более сложная ситуация соприкосновения трех подвижных сред представлена на рис. 13.6, *b*. Здесь должен быть баланс поверхностных сил как в горизонтальной, так и в вертикальной плоскостях, что дает два угла касания. Давление растекания можно определить как:

$$\Pi_S = \gamma_{AW} - (\gamma_{AO} + \gamma_{OW}). \tag{13.7}$$

На рис. 13.6, *b* $\Pi_S < 0$. Если $\Pi_S > 0$, то сумма свободных энергий поверхностей на границе раздела фаз «воздух–масло» и «масло–вода» меньше свободной энергии одной поверхности раздела «воздух–вода», и масло будет растекаться по поверхности воды. Из данных, приведенных в табл. 13.1, следует, что для керосина $\Pi_S = -8$ мН/м, и, следовательно, капля не будет растекаться (она действительно «прилипает» к поверхности раздела «воздух–вода»). Для триацилглицеринового масла Π_S будет равно 7 мН/м, и произойдет растекание. Эти аспекты очень важны для взаимодействий между каплями эмульсии и пузырьками пены. Такое давление растекания, конечно, может быть изменено с помощью ПАВ, однако большинство белков снижает γ_{AO} и γ_{OW} примерно на одинаковую величину, и поэтому давление почти не меняется.

На рис. 13.6, *c* изображена небольшая твердая частица, находящаяся на поверхности раздела фаз «масло–вода». В этом случае также применяется уравнение Юнга. Для кристалла триацилглицерина, находящегося на поверхности раздела «триацилглицериновое масло–вода» типичен краевой угол смачивания (около 140° в водной фазе). В этом случае внесение в водную фазу соответствующего ПАВ (например, *SDS*) может уменьшить краевой угол. Добавление большого количества ПАВ может даже привести к $\theta = 0$, а значит, и к полному смачиванию кристалла водной фазой, что используется в некоторых процессах для отделения кристаллов жира от жидкой масляной фазы. Адгезия кристаллов к поверхности раздела «масло–вода» и соответствующий краевой угол важны для стабильности эмульсии (см. раздел 13.6.5).

Следует отметить, что форма поверхностей раздела подвижных фаз, изображенных на рис. 13.6, под действием силы тяжести может меняться, но краевые углы при этом не меняются. Если капли не превышают 1 мм, то влияние силы тяжести обычно незначительно.

13.2.4. Криволинейные поверхности раздела фаз

Давление на вогнутой стороне криволинейной поверхности раздела фаз всегда больше, чем на выпуклой стороне [1]. Эта разница называется *давлением Лапласа* (p_L), которое равно

$$p_L = \frac{2\gamma}{R}, \tag{13.8}$$

где R — радиус кривизны (для сферической частицы R равен радиусу частицы r).

Важным следствием этого является то, что капли и пузырьки обычно имеют сферическую форму и их трудно деформировать, особенно если у них малый размер. Если капля не сферическая, то радиус кривизны изменяется с местоположением, что означает разность давления в пределах капли. Это заставляет вещество в капле перемещаться из областей более высокого давления в области более низкого давления до тех пор, пока капля не приобретет сферическую форму. Сферическая форма капли или пузырька может деформироваться только под воздействием внешнего напряжения. Здесь полезно привести некоторые примеры. Для капли эмульсии радиусом 0,5 мкм и с межфазным натяжением 0,01 Н/м давление Лапласа будет $4 \cdot 10^4$ Па (0,4 бар), и для существенной деформации капли потребуется значительное внешнее давление. При радиусе пузырька воздуха 1 мм и $\gamma = 0{,}05$ Н/м p_L равно 100 Па, что облегчает деформацию (см. также разделы 13.6.2, 13.6.4 и 13.7.1).

Другим следствием давления Лапласа является *капиллярный эффект* (рис. 13.7, *a*). В вертикальном капилляре, содержащем жидкость с нулевым краевым углом (например, вода в стеклянной трубке), образуется вогнутый мениск. В капилляре радиуса r между водой чуть ниже мениска и водой вне трубки на той же высоте возникает перепад давления величиной $2\gamma/r$. Уровень жидкости в трубке будет повышаться до тех пор, пока давление, создаваемое силой тяжести ($g \cdot \rho \cdot h$), не сравняется с капиллярным. Например, чистая вода в цилиндрическом капилляре с внутренним радиусом 0,1 мм поднимется на 15 см. При уве-

личении краевого угла подъем будет увеличиваться, а если он больше 90°, то происходит снижение уровня жидкости в капилляре.

Эти аспекты относятся к дисперсии порошков в воде. При внесении порции порошка в воду для смачивания частиц необходим капиллярный подъем воды через поры (пустоты) между частицами порошка (это необходимое условие для диспергирования, и, следовательно, для смачивания порошка). Для этого необходимо, чтобы краевой угол между материалом порошка, водой и воздухом был меньше 90°. Эффективный краевой угол внутри порошка существенно больше, чем у гладкой поверхности материала порошка и поэтому для смачивания порошка последний угол должен быть значительно меньше 90° (см. работу [73]).

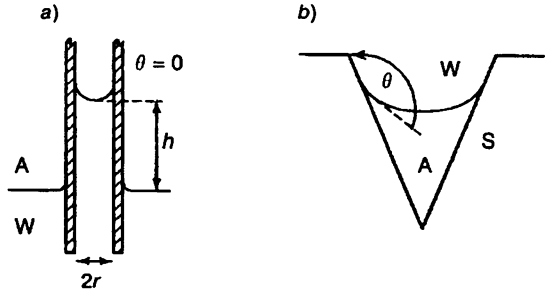


Рис. 13.7. Некоторые капиллярные явления: *a* — подъем жидкости в капилляре, если краевой угол θ = 0; *b* — воздушный карман в трещине твердого тела, погруженного в воду (пояснения в тексте)

Третье следствие давления Лапласа — это *повышенная растворимость* пузырька газа в окружающей его жидкости. Согласно уравнению (13.8) давление газа в пузырьке возрастает, а по закону Генри растворимость газа пропорциональна его давлению. Влияние кривизны частицы на растворимость ее вещества не ограничивается только пузырьками газа, и в общем случае для сферической частицы радиуса r оно описывается *уравнением Кельвина:*

$$RT\ln\frac{s(r)}{s_\infty}=\frac{2\gamma M}{\rho r}, \qquad (13.9)$$

где s — растворимость; s_∞ — растворимость в плоскости границы раздела (то есть «нормальная» растворимость); M и ρ — молярная масса и массовая плотность вещества в частице соответственно. Примеры вычислений с использованием уравнения (13.9) приведены в табл. 13.3 и показывают, что в большинстве систем для получения значительного эффекта необходим очень малый радиус частиц (например, менее 0,1 мкм). Тем не менее, растворимость пузырьков газа с радиусом 1 мм заметно выше.

Таблица 13.3
Примеры повышения растворимости вещества частицы благодаря кривизне [a]

Переменная	Вода-в-масле	Воздух в воде	Кристалл жира в масле	Кристалл сахара в насыщенном растворе
R, м	10^{-6}	10^{-4}	10^{-8}	10^{-8}
γ, Н/м	0,005	0,05	0,005	0,005
ρ, кг/м³	990	1,2	1075	1580
M, моль/кг	0,018	0,029	0,70	0,342
s_R/s_∞	1,000073	1,010	1,30	1,091

[a] Расчетные значения по уравнению (13.9) для некоторых произвольных радиусов кривизны и приемлемых значений межфазного натяжения (при температуре 300 К).

Повышенная растворимость приводит к явлению, называемому созреванием Оствальда, то есть к росту крупных частиц в дисперсии за счет малых и, в конечном счете, к исчезновению частиц самого малого размера. Вместе с тем, это происходит только в том случае, если вещество частиц в некоторой степени растворимо в дисперсионной среде. Тем самым созревание Оствальда может происходить в пенах и в эмульсиях типа «вода-в-масле», но не в эмульсиях «триацилглицериновое масло-в-воде». Скорость созревания Оствальда зависит от нескольких факторов (см. об этом раздел 13.7.2).

Созревание Оствальда всегда происходит у кристаллов в насыщенном растворе (хотя и медленно, если кристаллы большие). Еще одним эффектом созревания Оствальда является «округление» мелких кристаллов. На краю кристалла радиус кривизны может быть очень малым (например, несколько нм), что

приводит к значительному повышению растворимости (см. табл. 13.3, кристалл жира в масле). Поэтому вещество вблизи края будет растворяться и осаждаться где-то в другом месте. Небольшие кристаллы льда (размером около 20 мкм) в частично замороженных пищевых продуктах обычно имеют довольно изометрическую форму.

Если поверхность частицы не выпуклая, а (частично) вогнутая (рис. 13.7, *b*), то ее растворимость снижается. Если описанная ситуация отображает локальное равновесие, то концентрация газа в жидкости ниже насыщения, а если концентрация газа будет выше, то показанный на рисунке газовый карман будет увеличиваться.

13.2.5. Реологические свойства на межфазных границах

Рассмотрим реологические свойства на межфазных границах в присутствии ПАВ. Различают два типа таких свойств: при сдвиге и при дилатации (расширении с сохранением формы, рис. 13.8). При сдвиге поверхности раздела (площадь и количество ПАВ на поверхности раздела не меняются) можно измерить необходимую для сдвига силу в плоскости поверхности раздела [4, 5, 39, 87]. Если измерения проводят в зависимости от скорости сдвига, то получают *сдвиговую вязкость поверхности*, η_{SS} (Н·с/м). Для большинства ПАВ значение η_{SS} пренебрежимо мало (в отличие от некоторых полимерных ПАВ). Например, для мономолекулярного слоя казеината натрия эта вязкость составляет 0,002 Н·с/м, а для слоев глобулярных белков значения η_{SS} находятся между 0,01 и 1 Н·с/м. В большинстве систем при сдвиге происходит разжижение и наблюдаемая вязкость является кажущейся вязкостью. Опубликованные данные для глобулярных белков значительно варьируют, отчасти вследствие экспериментальной неопределенности: монослой может течь (то есть он имеет предел текучести) или разрываться, при этом измеряемая вязкость будет существенно зависеть от характера разрыва [44]. Для некоторых белков с увеличением возраста мономолекулярного слоя вязкость значительно увеличивается из-за образования межмолекулярных связей [16].

Если площадь поверхности раздела увеличивается без изменения формы, то возрастает и поверхностное натяжение, поскольку Г уменьшается. Изменение поверхностного натяжения обычно выражают в виде *дилатационного модуля (модуля вязкоупругости)*:

$$E_{SD} \equiv \frac{d\gamma}{d\ln A}, \tag{13.10}$$

где A — площадь поверхности раздела.

Модуль E_{SD} конечен для всех ПАВ, хотя при высокой активности ПАВ и низкой скорости увеличения поверхности его величина будет очень малой. В этом случае ПАВ быстро диффундирует из объема к увеличенной поверхности, тем самым повышая Г и уменьшая γ. Другими словами, равновесие между объемной (c_{eq}) и поверхностной (Г) концентрациями будет быстро восстановлено. Следовательно, E_{SD} с уменьшением скорости деформации сильно снижается. Для белков E_{SD} может быть как большим, так и малым в зависимости от масштаба времени, поскольку белки адсорбируются более или менее необратимо. Однако концентрация белков на поверхности раздела фаз имеет огромное значение: как показано на рис. 13.3, *b*, для достижения значительной поверхностной активности П (и, следовательно, E_{SD}) значение удельной адсорбции Г должно быть большим. На модуль могут также влиять конформационные изменения белка при адсорбции и дилатации.

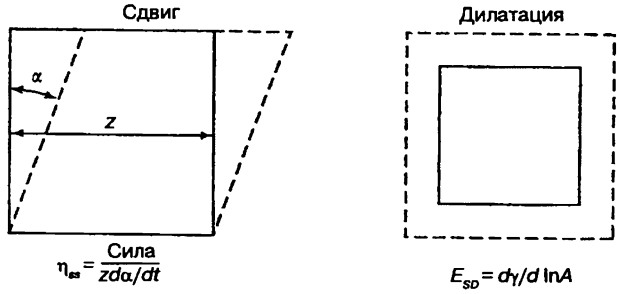


Рис. 13.8. Иллюстрация геометрических изменений элемента поверхности при простом сдвиге и при дилатации

Показатель E_{SD} участвует в нескольких уравнениях, относящихся к межфазным явлениям. Проблема заключается в том, что измерить E_{SD} трудно или даже невозможно (за исключением относительно длительных масштабов времени и/или малых деформаций). В общем, для глобулярных белков на поверхности раздела «воздух–вода» наблюдались значения около 30–100 мН/м, а для β-казеина — около 10–20 мН/м [4, 29, 52, 71], причем его значения на поверхностях раздела «масло–вода» и «воздух–вода» могут существенно различаться.

Поверхностные реологические характеристики белковых слоев зависят, естественно, от значения pH, ионной силы, качества растворителя, температуры и т. д. Зачастую значения модуля вязкоупругости и вязкости достигают максимума вблизи изоэлектрической точки. Кроме того, следует отметить, что можно также измерить поверхностную дилатационную вязкость и поверхностный модуль сдвига.

13.2.6. Градиенты поверхностного натяжения

На поверхности раздела жидкой фазы, содержащей ПАВ, могут возникать градиенты поверхностного натяжения. Для поверхности раздела «воздух–вода» эта ситуация представлена на рис. 13.9, *a*. Градиент скорости ($\nabla v = dv_y/dx$) сносит молекулы ПАВ в направлении течения, создавая градиент поверхностного натяжения, и в направлении течения γ будет уменьшаться. Это означает, что поверхность создает действующее на жидкость касательное напряжение $\Delta\gamma/\Delta x$. При достаточно большом градиенте это напряжение может быть равным и противоположным напряжению сдвига $\eta \cdot \nabla v$ (η — вязкость жидкости), и, следовательно, поверхность будет неподвижной. Если ПАВ отсутствует, то поверхность будет двигаться вместе с текущей жидкостью; в случае поверхности раздела «масло–вода» скорость течения в поперечном сечении поверхности раздела непрерывна.

Это влечет важные последствия, особенно для пен, что видно при сравнении рис. 13.9, *c* и *d*. В отсутствие ПАВ жидкость между двумя пузырьками пены быстро движется вниз подобно падающей капле, тогда как в присутствии ПАВ это течение значительно замедляется, поскольку «стенки» пленки теперь могут выдержать напряжение, создаваемое текущей вниз жидкостью. Другими словами, создание градиентов поверхностного натяжения необходимо для образования пены. Это также означает, что у небольшого пузырька воздуха или капли эмульсии, движущихся в окружающей их жидкости, почти всегда будет неподвижная поверхность, то есть они ведут себя как твердые частицы. В этих случаях градиент поверхностного натяжения γ может быть весьма большим, поскольку Δx мало.

Рис. 13.9, *b* иллюстрирует ситуацию, при которой жидкость, граничащая с поверхностью раздела, будет двигаться вместе с этой поверхностью при наличии (по разным причинам, например, в результате локальной адсорбции ПАВ) градиента поверхностного натяжения. Это явление называется эффектом Марангони. Он наблюдается, например, в стакане с вином, где капли вина над уровнем жидкости имеют тенденцию двигаться вверх; это связано с испарением этанола, вызывающим локальное увеличение поверхностного натяжения γ и, тем самым, с созданием градиента γ.

Важное следствие эффекта Марангони состоит в том, что тем самым обеспечивается стабильность тонкой пленки (рис. 13.9, *e*). Если на пленке каким-то образом образуется тонкий участок (пятно), то площадь поверхности пленки локально увеличивается, и, следовательно, Г снижается, γ увеличивается, и создается градиент γ. Это заставляет приграничную жидкость течь по направлению к тонкому пятну, восстанавливая толщину пленки. Этот «механизм Гиббса» объясняет стабильность тонких пленок жидкости (например, в пене).

Градиенты поверхностного натяжения очень важны для предотвращения коалесценции капель, образующихся при эмульгировании (см. раздел 13.6.2). Во всех этих ситуациях эффект зависит от упругости пленки (упругости Гиббса), которая определяется как удвоенный модуль вязко-

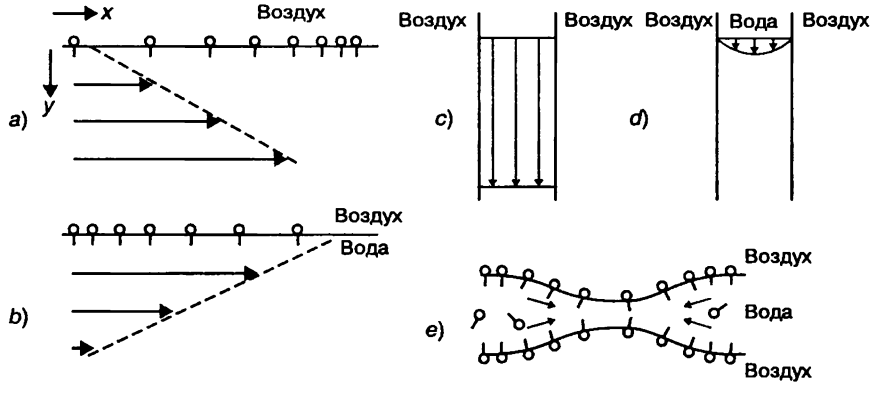


Рис. 13.9. Градиенты поверхностного натяжения на поверхности раздела «воздух–вода»: *a* — течение жидкости вдоль поверхности создает градиент поверхностного натяжения; *b* — эффект Марангони: градиент поверхностного натяжения вызывает течение прилегающей жидкости; *c* — дренаж жидкости из вертикальной пленки в отсутствие ПАВ; *d* — дренаж жидкости из вертикальной пленки в присутствии ПАВ; *e* — механизм Гиббса для стабильности пленки. По [82]

упругости (поскольку у пленки две поверхности). Тонкие пленки обычно обладают большой упругостью из-за недостатка растворенного ПАВ. В толстой пленке с довольно высокой концентрацией ПАВ молекулы последнего могут быстро диффундировать к области с низкой поверхностной активностью и восстановить первоначальное поверхностное натяжение. В тонкой пленке, обладающей большой упругостью, это не происходит или происходит очень медленно (за исключением весьма длительных масштабов времени).

13.2.7. Функции ПАВ

Присутствие ПАВ в пищевом продукте, будь то низкомолекулярные амфифилы или белки, может вызывать несколько эффектов, которые кратко перечислены ниже.

Вследствие снижения γ уменьшается давление Лапласа, и поверхность раздела легче деформируется. Это важно для образования эмульсий и пен (см. раздел 13.6.2), а также для возникновения коалесценции (см. раздел 13.6.4).

ПАВ влияют на краевой угол, который важен для процессов смачивания и диспергирования. Краевой угол определяет, может ли твердая частица адсорбироваться на поверхности раздела подвижных (текучих) сред и до какой степени она при этом выступает в жидкую фазу. Эти аспекты играют важную роль для стабильности некоторых эмульсий (см. раздел 13.6.5) и пен (см. раздел 13.7.2).

Уменьшение межфазной свободной энергии пропорционально замедляет созревание Оствальда. На скорость последнего также влияет поверхностный дилатационный модуль (см. раздел 13.7.2).

Присутствие ПАВ приводит к возникновению градиентов поверхностного натяжения, что может быть их важнейшей функцией. Это необходимо для образования и стабильности эмульсий и пен (см. разделы 13.6.2, 13.6.4, 13.7.1 и 13.7.2).

- Адсорбция ПАВ на частицах значительно изменяет (коллоидные) силы взаимодействия частиц, в основном увеличивая силы отталкивания и стабильность (см. раздел 13.3).

  Низкомолекулярные амфифильные вещества могут образовывать мицеллы, во внутренней части которых накапливаются некоторые гидрофобные молекулы (например, молекулы масла). Это значительно увеличивает кажущуюся растворимость некоторых гидрофобных веществ и создает основу моющего действия ПАВ.

  Низкомолекулярные ПАВ могут взаимодействовать с макромолекулами. Ионные амфифилы зачастую ассоциируются с белками, существенно изменяя их некоторые свойства (например, изоэлектрическую точку, кажущуюся растворимость и поверхностную активность). Другим примером может служить взаимодействие некоторых липидоподобных ПАВ с амилозой.

13.3. Коллоидные взаимодействия

Определение и классификация коллоидов приведены в разделе 13.1.2. Обычно между частицами действуют силы, обусловленные материальными свойствами частиц (природой материала частиц) и примыкающей к ним жидкости. Эти силы коллоидного взаимодействия действуют в направлении, перпендикулярном поверхности частицы (в отличие от поверхностных сил, рассмотренных в разделе 13.2 и действующих в плоскости поверхности). При этом действуют как силы притяжения, так и силы отталкивания. Результирующая сила взаимодействия, действующая между коллоидными частицами, имеет следующие важные последствия.

- Она определяет, будут ли частицы агрегироваться (см. раздел 13.4.3), что, в свою очередь, может определить дальнейшую физическую нестабильность. Например, агрегация частиц может привести к повышенной седиментации, а значит, и к быстрому образованию отстоя или осадка. (Также используют термины «флокуляция» и «коагуляция», часто с определенным дополнительным акцентом: первый из них относится к обратимой агрегации, а второй — к необратимой).
- Агрегирующие частицы могут образовать пространственную структурную сетку, то есть гель (см. раздел 13.5). Реологические свойства и стабильность систем с такой структурной сеткой существенно зависят от коллоидных взаимодействий.

- Силы взаимодействия влияют на склонность к коалесценции капель эмульсии и газовых пузырьков, а также к частичной коалесценции жировых глобул (см. разделы 13.6.4 и 13.6.5).

Результирующее влияние коллоидных взаимодействий зависит и от внешних сил, создаваемых, например, гравитацией, перемешиванием или градиентом электрического потенциала, а также от размера и формы частиц. Более того, значительно изменить величину сил отталкивания может адсорбция ПАВ на частицах.

Далее мы вкратце рассмотрим некоторые аспекты коллоидных взаимодействий (как правило, для простых случаев идентичных областей). Литературу по коллоидам см. в разделе «Дополнительная литература».

13.3.1. Ван-дер-Ваальсовы силы притяжения

Ван-дер-Ваальсовы межмолекулярные силы действуют и между такими крупными объектами, как коллоидные частицы. Так как эти силы аддитивны, оказывается, что в определенных пределах зависимость силы взаимодействия от расстояния между частицами (измеряемого между их внешними поверхностями) намного слабее, чем между молекулами. Для двух идентичных сферических частиц свободная энергия взаимодействия Ван-дер-Ваальса задается соотношением

$$V_A \approx \frac{Ar}{12h}, \; h \lesssim 10 \text{ нм}, \tag{13.11}$$

где r — радиус частицы; h — расстояние между частицами; A — постоянная Хамакера (*Hamaker*), которая зависит от природы частиц и подвижной (текучей) среды между ними, причем ее значение повышается с увеличением различий в свойствах этих двух фаз. Для большинства частиц в пищевых продуктах на основе воды A находится между 1 и 1,5 kT (при комнатной температуре $kT \approx 4 \cdot 10^{-21}$ Дж), но для пузырьков воздуха в воде A намного больше, около 10 kT. Табличные значения постоянной Хамакера см. в работах [31, 42, 43, 79].

Если обе частицы одинаковы по своей химической природе, то независимо от промежуточной жидкой или газовой среды A всегда имеет положительное значение и частицы притягиваются друг к другу. Если же их природа различна, то A может быть отрицательной, и в этом случае действуют Ван-дер-Ваальсовы силы отталкивания, однако такая ситуация встречается довольно редко.

13.3.2. Электрические бислои

Благодаря адсорбированным ионам или ионным ПАВ большинство частиц в водном растворе имеет электрический заряд. В подавляющем числе пищевых продуктов эти заряды преимущественно отрицательные. Так как система должна быть электрически нейтральной, частицы сопровождает «облако» противоположно заряженных ионов, так называемых противоионов. Пример распределения противо- и коионов приведен на рис. 13.10, *a*.

На определенном расстоянии от поверхности концентрации положительных и отрицательных зарядов в растворе выравниваются. На меньшем расстоянии заряд частицы нейтрализуется избыточными противоионами в электрическом бислое. Последний определяется как зона между поверхностью частицы и плоскостью, в которой достигается нейтрализация. Бислой не следует считать иммобилизованным, поскольку молекулы растворителя и ионы диф-

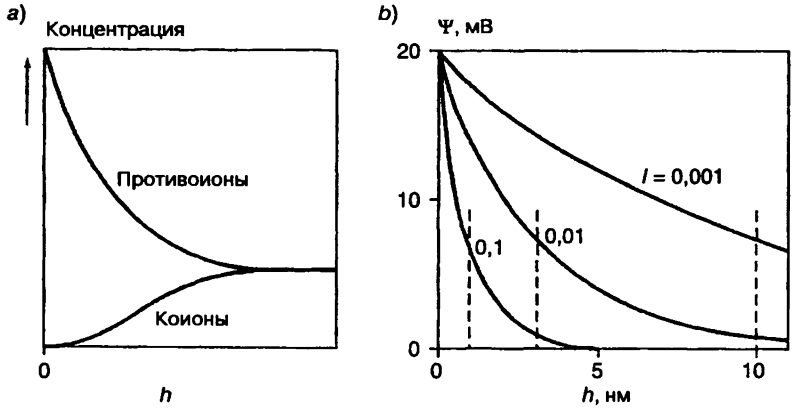


Рис. 13.10. Электрический бислой: *a* — распределение противо- и коионов как функция расстояния h от заряженной поверхности; *b* — потенциал Ψ как функция расстояния для трех значений ионной силы I, мМ; пунктирными линиями обозначена дебаевская длина ($1/\kappa$)

фундируют как в него, так и из него. Электрические эффекты обычно выражаются электрическим потенциалом Ψ, В. Его значение как функция расстояния h от поверхности описывается уравнением

$$\Psi = \Psi_0 \exp(-\kappa h), \tag{13.12}$$

где Ψ_0 — потенциал на поверхности, а номинальная толщина электрического бислоя или дебаевская длина $1/\kappa$ для разбавленных водных растворов при комнатной температуре задается соотношением

$$\kappa \approx 3{,}2 I^{0{,}5}, \text{ нм}^{-1}. \tag{13.13}$$

Ионная сила I зависит от общей концентрации ионов и определяется как

$$I \equiv \frac{1}{2}\sum m_i z_i^2, \tag{13.14}$$

где m_i и z_i — соответственно молярная концентрация и валентность каждого из присутствующих видов ионов.

Для соли NaCl I равняется молярной концентрации раствора, но если присутствуют ионы более высокой валентности, то это равенство нарушается. Для $CaCl_2$ ионная сила равна молярной концентрации, умноженной на 3.

На рис. 13.10, *b* показан потенциал как функция расстояния для трех значений ионной силы I. Ионные силы в пищевых продуктах на основе воды варьируют от 1 мМ (обычная водопроводная вода) до более 1 М (маринованные продукты). Значение I для молока составляет около 0,75 М, а для крови — около 0,14 М. Следовательно, зачастую толщина бислоя составляет около 1 нм и менее.

Электрические взаимодействия зависят от поверхностного потенциала, который обычно зависит от значения pH. Для большинства пищевых систем значения $|\Psi_0|$ меньше 30 мВ. При высокой концентрации противоионов (особенно двухвалентных) из противоионов и заряженных групп на поверхности частицы могут образоваться ионные пары, что влечет снижение $|\Psi_0|$.

В неводной фазе диэлектрическая постоянная, как правило, намного меньше, чем в воде, и уравнение (13.12) не имеет силы. Кроме того, ионная сила в этой ситуации обычно незначительна, то есть даже при заряженной поверхности (как в случае капель воды, плавающих в масле) электрические силы взаимодействий обычно имеют второстепенное значение.

13.3.3. Теория ДЛФО

Если частицы с зарядом одного знака оказываются на очень близком расстоянии, их электрические бислои перекрываются, и частицы отталкиваются друг от друга. Можно вычислить свободную энергию отталкивающего электрического взаимовлияния V_E. Для сфер равного размера V_E в первом приближении задается пропорциональностью

$$V_E \propto r\Psi_0^2 \exp(-\kappa h). \tag{13.15}$$

Энергии взаимодействия V_A (обусловленные силами притяжения Ван-дер-Ваальса) и V_E можно складывать. Это привело к появлению первой полезной теории стабильности коллоидов, известной как теория Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека (теория ДЛФО). Эта теория дает возможность вычислять общую свободную энергию V, необходимую для сближения двух частиц, находящихся на бесконечном удалении друг от друга, до расстояния h. Подробности расчетов мы здесь уточнять не будем, поскольку для пищевых систем точное вычисление, как правило, невозможно. Общую энергию взаимодействия обычно делят на kT, то есть на среднюю кинетическую энергию столкновения двух частиц, обусловленного броуновским (тепловым) движением.

Теперь рассмотрим некоторые тенденции, основываясь на рис. 13.11. Кривая *1* дает пример сил притяжения Ван-дер-Ваальса, которые с уменьшением расстояния между частицами всегда становятся прочнее. Кривая 2 — это пример суммы притяжения Ван-дер-Ваальса и электростатического отталкивания. В данном случае кривая имеет так называемый вторичный минимум вблизи точки *C*, и под воздействием броу-

новского движения пара частиц легко достигает этой точки. Значение V здесь около $-3kT$, и его достаточно для агрегации частиц. Тем не менее, частицы могут дезагрегироваться, поскольку в этом примере чистое (результирующее) притяжение довольно слабое. Пара частиц даже может случайно преодолеть в точке B (около 10 kT) максимум свободной энергии, и в этом случае они достигнут основного минимума A, который настолько глубок, что частицы становятся постоянно агрегированными. Хотя согласно уравнению (13.11) V_A при $h \to 0$ стремится к $-\infty$, это условие не выполняется, поскольку при очень малых значениях h в поверхностном слое двух частиц начинают действовать межатомные ядерные силы отталкивания.

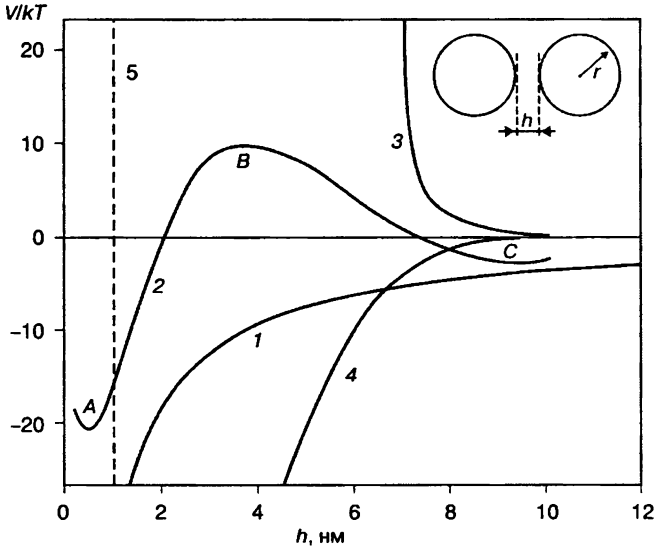


Рис. 13.11. Расчетные примеры свободной энергии взаимодействия V между двумя частицами как функции расстояния h между ними; в верхем правом углу дано разъяснение рассматриваемой геометрии. Обозначения кривых: *1* — силы притяжения Ван-дер-Ваальса; *2* — ДЛФО-взаимодействия; *3* — силы стерического отталкивания; *4* — силы деплетивного взаимодействия (пояснения в тексте). По Walstra P. et al. *Dairy Science and Technology.* CRC/Taylor & Francis, 2006

Обычно изменить силы притяжения Ван-дер-Ваальса невозможно, однако электростатическое отталкивание изменить несложно. При снижении ионной силы электростатическое отталкивание действует на большем расстоянии, и вторичный минимум фактически исчезает. Увеличение заряда на частицах, то есть $|\Psi_0|$, внесение ионного ПАВ или изменение значения pH приводят к увеличению максимума кривой и, следовательно, к предотвращению постоянной агрегации. Если значение $|\Psi_0|$ мало, а I — велико, то силы притяжения будут преобладать на всех расстояниях, и частицы будут быстро агрегироваться.

Хотя теория ДЛФО успешно применяется для многих неорганических систем, она неудовлетворительно прогнозирует стабильность большинства биогенных систем. Глобулы молочного жира, например, устойчивы к агрегации в их изоэлектрической точке (pH 3,8), но поскольку в этом случае у них нулевой поверхностный потенциал, теория ДЛФО прогнозирует нулевое отталкивание [88]. Следовательно, здесь важны силы взаимодействия, отличные от рассматриваемых этой теорией.

13.3.4. Силы стерического отталкивания

Некоторые адсорбированные молекулы (полимеры, Твины и т. д.) имеют гибкие молекулярные цепочки («волоски»), которые выступают в дисперсионную среду (см. рис. 13.4) и могут вызвать стерическое отталкивание. Здесь можно выделить два механизма. Во-первых, близкая поверхность другой частицы ограничивает возможные конформации «волосков», а это означает потерю энтропии и, следовательно, увеличение свободной энергии, в результате чего происходит отталкивание. Эффект ограничения объема может быть очень большим, но он важен только в случае очень низкой плотности «волосков» на поверхности (количество «волосков» на единицу площади). Это связано с тем, что при сближении частиц «волосистые» слои начинают частично накладываться, и тогда, прежде чем сработает первый механизм, начнет действовать второй. Такое наложение приводит к повышенной концентрации выступающих «волосков» и тем самым к увеличению осмотического давления, которое вызывает миграцию влаги в область наложения, что приводит к отталкиванию. Тем не менее, это верно только в том случае, когда дисперсионная среда является для «волосков» хорошим растворителем, — в противном случае результатом может быть притяжение. Например, капли эмульсии, покрытые казеином, имеют выступающие «волоски», обеспечивающие стабильность этих капель. Если в такую эмульсию добавить этанол, то качество растворителя резко снизится и капли будут агрегироваться [18].

В некоторых случаях свободную энергию стерического отталкивания можно вычислить с приемлемой точностью [26]. При сложении этих значений с Ван-дер-Ваальсовыми силами притяжения получают кри-

вые зависимости общего взаимодействия от расстояния между частицами. Здесь очень важно качество растворителя, и если оно хорошее, то отталкивание может быть очень сильным (кривая *3* на рис. 13.11). В обычных пищевых системах вычисление стерического отталкивания, как правило, невозможно из-за большой сложности. В частности, может значительно меняться поведение адсорбирующихся молекул [21, 26, 83]. Примером могут служить такие белки, как казеины, — при адсорбции они образуют выступающие «волоски», способные нести электрические заряды, которые могут увеличить отталкивание.

С другой стороны, полимеры при одновременной адсорбции на двух частицах могут вызвать мостиковую агрегацию [26, 83]. Это может произойти, если для полного покрытия площади поверхности частицы слишком мало полимера или если применяются определенные методы обработки. Кроме того, такие связи могут образовываться между адсорбированными белками (например, вследствие образования при высоких температурах мостиков —S—S— или мостиков —Ca— между отрицательными зарядами «волосков» в присутствии достаточного количества ионов Ca^{2+}). В целом, небольшие изменения в составе водной дисперсии могут существенно сказаться на коллоидной стабильности.

13.3.5. Деплетивное взаимодействие

Кроме полимерных цепочек, выступающих над поверхностью, на коллоидное взаимодействие могут влиять присутствующие в растворе полимерные молекулы. Рассмотрим жидкую дисперсию (например, эмульсию), в которой также присутствует некий (неадсорбирующийся) растворенный полимер, например, ксантан. Центр молекулы полимера не может приблизиться к поверхности ближе, чем на значение Δ, которое почти равно ее радиусу R_g (рис. 13.12). Следовательно, некоторый слой жидкости оказывается обеднен полимером (деплетирован). Это означает, что из-за присутствия капель эмульсии концентрация полимеров в объеме жидкости возрастает, и осмотическое давление $\Pi_{осм}$ раствора повышается. Если теперь две капли тесно сближаются (то есть становятся агрегированными), то часть их обедненных слоев перекрывается и концентрация полимера в объеме жидкости снижается. Следовательно, снижается и осмотическое давление. Так как система всегда стремится к снижению осмотического давления, возникает движущая сила для агрегации капель.

Свободная энергия этого взаимодействия приблизительно равна

$$V_D \approx -2\pi r \Pi_{осм}(2\delta - h)^2,\ 0 < h < 2\Delta,\ r >> \Delta. \qquad (13.16)$$

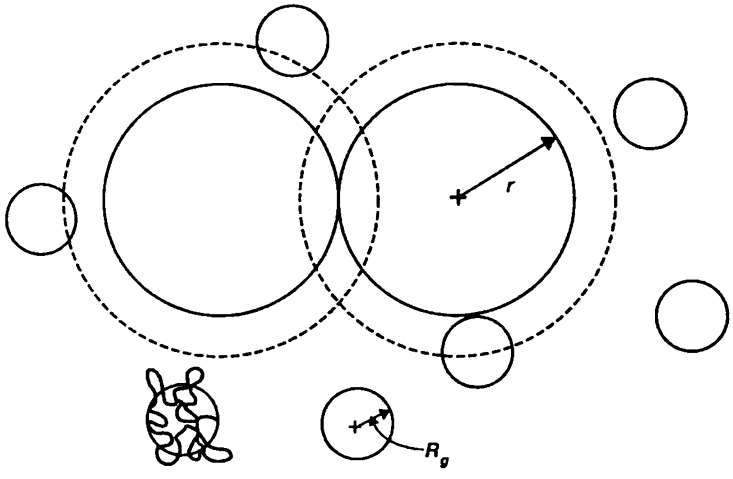


Рис. 13.12. Схематическое представление обеднения (деплетирования) поверхности коллоидных частиц (радиуса *r*, изображенного большими окружностями) неадсорбирующимися молекулами полимера (с радиусом инерции R_g, изображенным малыми окружностями) и перекрытия зон обеднения (ограниченных пунктирными линиями) при агрегации частиц. По [83]

В первом приближении она пропорциональна молярной концентрации полимера, но зависит и от качества растворителя. В результате, даже низкие концентрации полисахаридов могут вызывать деплетивную агрегацию в пищевых продуктах; так, для этого может быть достаточно 0,03% ксантана ($R_g \approx 30$ нм) [18]. Примером служит кривая *4* на рис. 13.11. Существенно более высокие концентрации полимера зачастую приводят к образованию геля, фиксирующего частицы (разделы 13.4.2 и 13.5.1).

13.3.6. Прочие аспекты

Теперь понятно, что в пищевых продуктах могут происходить коллоидные взаимодействия нескольких видов и что тип и концентрация присутствующих ПАВ существенно влияют на эти взаимодействия. Даже в простейших случаях важны несколько переменных (табл. 13.4).

Следует упомянуть о некоторых дополнительных осложнениях. Теория ВДФО не применима на очень малых расстояниях, а также неудовлетворительно прогнозирует влияние размера частиц (причиной может быть шероховатость их поверхности).

На очень малых расстояниях между частицами могут происходить *гидрофобные взаимодействия*, которые обычно вызывают притяжение. Этот эффект является следствием плохого качества растворителя. Такой вид взаимодействия характеризуется сильной температурной зависимостью — очень слабое взаимодействие вблизи 0 °С, усиливающееся с повышением температуры. Подобные гидрофобные взаимодействия могут происходить и при использовании в качестве ПАВ белка. Тем не менее, даже в этом случае конечным результатом обычно является отталкивание, что обусловлено сочетанием стерического и электростатического отталкивания, но вычисление свободной энергии такого взаимодействия, как правило, невозможно. Если значение pH близко к изоэлектрической точке адсорбированного белка, то электростатическое отталкивание может замениться электростатическим притяжением между отрицательными и положительными группами на поверхностях. Более того, в этом случае может произойти гидрофобное притяжение, и покрытые белком частицы, как правило, агрегируются при условиях, близких к их изоэлектрической точке.

Таблица 13.4

Факторы, влияющие в системах на основе воды на величину вкладов в свободную энергию взаимодействия (V) между частицами

Переменная	V_A	V_E	V_S
Размер частиц	+	+	(+)
Вещество частицы	+	–	–
Адсорбированный слой	(+)	+	+
pH	–	+	–[а]
Ионная сила		+	
Качество растворителя	–	–	+

Нижние индексы: *A* — Ван-дер-Ваальсовы силы притяжения; E — силы электростатического отталкивания; *S* — силы стерического отталкивания;

Обозначения: + — эффект наблюдается; – — эффект не наблюдается; (+) — эффект наблюдается при определенных условиях.

[а] В отсутствие электрических зарядов.

13.4. Жидкие дисперсии

13.4.1. Общие вопросы

Существует несколько типов жидких дисперсий. Здесь мы ограничимся суспензиями (дисперсиями твердых частиц в жидкости) и теми аспектами эмульсий, которые подчиняются тем же правилам. К пищевым суспензиям относятся обезжиренное молоко (казеиновые мицеллы в молочной сыворотке), кристаллы жира в жидкой жировой (масляной) фазе, многие фруктовые и овощные соки (растительные клетки, их кластеры и фрагменты в водном растворе) и некоторые готовые пищевые продукты (например, супы). С суспензиями также сталкиваются во время переработки (приготовления) пищевого продукта (например, зерна крахмала в воде, кристаллы сахара в насыщенном растворе и белковые агрегаты в водной фазе).

Для дисперсий характерны несколько видов нестабильности, которые схематично представлены на рис. 13.13. Различают изменения размера частиц и их взаиморасположения, включая образование небольших агрегатов частиц. Растворение и увеличение размера частиц зависят от концентрации вещества, его растворимости, а также от диффузии.

Образованию частиц в перенасыщенном растворе должно предшествовать образование зародышей. Созревание Оствальда рассматривается в разделах 13.2.4 и 13.7.2, а коалесценция — в разделе 13.6.4.

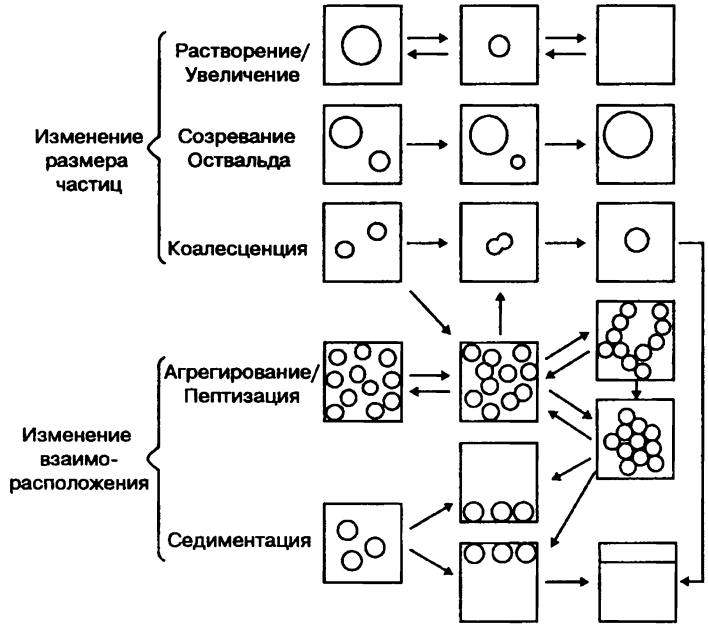


Рис. 13.13. Схематическое представление изменений дисперсности

Различные изменения могут влиять друг на друга (рис. 13.13). Более того, седиментация усиливается с увеличением размера частиц и если частицы стремятся к агрегации, то увеличивается скорость агрегации. Перемешивание жидкости повышает скорость некоторых изменений, но может нарушить седиментацию и разрушить большие агрегаты.

13.4.2. Седиментация

Если плотности (ρ) дисперсной фазы (нижний индекс $_D$) и дисперсионной среды (нижний индекс $_C$) различаются, на частицы действует выталкивающая сила. Согласно закону Архимеда результирующая сила для сфер в направлении седиментации равна $a\pi d^3(\rho_D - \rho_C)/6$, где a — ускорение. При ускорении сферы на нее действует сила трения, величина которой согласно Стоксу составляет $3\pi d\eta_C v$, где η_C — вязкость дисперсионной среды, а v — мгновенная скорость (относительно дисперсионной среды). Полагая обе силы равными, получаем следующее выражение для равновесной или стоксовой скорости седиментации:

$$v_S = \frac{a(\rho_D - \rho_C)d^2}{18\eta_C}. \tag{13.17}$$

Если частицы имеют разный размер, d^2 заменяется на $\sum n_i d_i^5 / \sum n_i d_v^3$, где n_i — количество частиц в единице объема с диаметром d_i в i-м классе (интервале группировки).

Для гравитационного осаждения $a = g = 9{,}81$ м/с^2, а для осаждения центрифугированием $a = R\omega^2$, где R — эффективный радиус центрифуги, а ω — скорость ее вращения (рад/с). Например, если диаметр сферы равен 1 мкм, разность плотностей — 100 кг/м^3, а вязкость дисперсионной среды (воды) — 1 мПа·с, то под действием силы тяжести сферы будут осаждаться со скоростью 55 нм/с или 4,7 мм/сут. Седиментация в значительной степени зависит от размера частиц, и сферы диаметром 10 мкм переместятся за сутки на 47 см. Обычно с увеличением температуры вязкость снижается, а скорость седиментации возрастает. Если разница плотностей в уравнении (13.17) отрицательна, то происходит «верхняя седиментация», и в этом случае обычно говорят об отстаивании (образовании сливок); «нижняя седиментация» может быть названа осаждением.

Хотя уравнение Стокса очень полезно для прогнозирования тенденций, его достоверность в большинстве случаев невелика. Что касается различных факторов, вызывающих отклонение от уравнения (13.17), то для пищевых продуктов наиболее важны следующие [85].

- Частицы не являются гомогенными сферами. Асимметричная частица осаждается медленно, поскольку при седиментации она принимает ориентацию, максимизирующую трение (то есть частица в форме параллелепипеда принимает «горизонтальную» ориентацию). Агрегат частиц, даже сферический, осаждается медленнее гомогенной сферы того же размера, так как из-за присутствия жидкости внутри агрегата эффективная разница плотностей уменьшается.

  Конвекционные потоки в дисперсии (вызванные, например, незначительными колебаниями температуры) могут существенно нарушить седиментацию небольших частиц (размером менее 1 мкм).

  Если объемная доля частиц (ϕ) не очень мала, то скорость седиментации снижается согласно уравнению $v = v_S(1-\phi)^8$. При $\phi = 0{,}1$ скорость седиментации снижается на 57%.

  Если частицы агрегируются, то скорость седиментации возрастает (увеличение d^2 всегда больше, чем уменьшение $\Delta\rho$). Кроме того, поскольку крупные агрегаты осаждаются быстрее, они «настигают» более мелкие и таким образом становятся еще больше, дополнительно увеличивая скорость седиментации. В результате скорость седиментации может возрасти на несколько порядков. Хороший пример — это быстрое образование сливок в холодном свежем молоке, жировые глобулы в котором агрегируются благодаря присутствию криоглобулинов [88].

  Уравнение (13.17) неявно предполагает, что вязкость является ньютоновской, то есть не зависит от скорости (или напряжения сдвига), но это предположение для многих жидких пищевых продуктов не выполняется. Некоторые примеры зависимости кажущейся вязкости η_a от напряжения сдвига приведены на рис. 13.14. Напряжение, вызванное частицей, задается выталкивающей силой над ее поперечным сечением, которая для сфер примерно равна $dg\Delta\rho$. Для многих частиц это напряжение составляет около 1 мПа, то есть именно такое напряжение частицы испытывают при седиментации.

Вязкость следует измерять при этом напряжении (σ) (или при соответствующей скорости сдвига σ/η_a), тогда как в большинстве вискозиметров применяются напряжения намного больше 1 Па. На рис. 13.14 показано, что кажущаяся вязкость в зависимости от приложенного напряжения сдвига может отличаться на несколько порядков.

Пример жидкости с небольшим пределом текучести приведен на рис. 13.14. При напряжении сдвига ниже предела текучести эта жидкость не течет, однако при обращении с жидкостью такое состояние остается незамеченным из-за очень малого значения предела текучести (напряжение 1 Па соответствует «столбу» воды высотой 0,1 мм). Тем не менее, зачастую этого достаточно, чтобы предотвратить седиментацию (или отстаивание), а также агрегацию. Примерами жидких пищевых продуктов с пределом текучести являются соевое молоко, многие фруктовые соки, шоколадное молоко (молочно-шоколадный напиток) и некоторые салатные заправки (дрессинги). Подробнее эти аспекты рассмотрены в разделе 13.5.2.

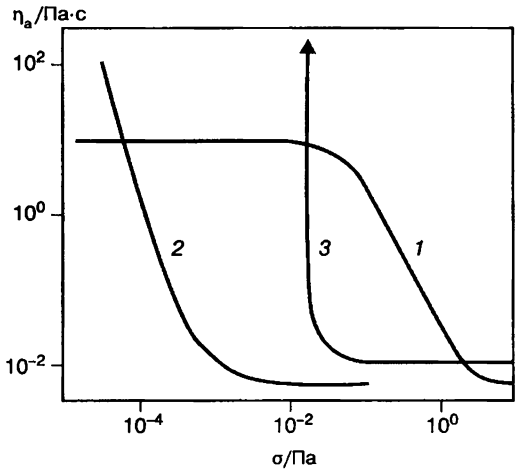


Рис. 13.14. Схематические примеры неньютоновского течения жидкостей с кажущейся вязкостью η_a как функцией напряжения сдвига σ: *1* — типичная кривая для раствора полимера; *2* — кривая для слабо агрегирующей дисперсии очень мелких частиц; *3* — кривая для системы с пределом текучести. По [85]

13.4.3. Агрегация

Броуновское движение частиц в жидкости приводит к частым столкновениям самих частиц. Такие столкновения могут вызывать агрегацию, определяемую как состояние, в котором тесное расположение частиц сохраняется в течение значительно более длительного времени, чем при отсутствии притягивающего коллоидного взаимодействия. Вычисление скорости агрегации обычно основывается на теории перикинетической агрегации Смолуховского [62]. Начальная скорость агрегации в разбавленной дисперсии сфер равного размера описывается уравнением

$$-\frac{dN}{dt} = \frac{4kTN^2}{3\eta W}, \tag{13.18}$$

где N — число неагрегированных частиц и агрегатов в единице объема, а коэффициент устойчивости W предполагался Смолуховским равным единице.

Время, необходимое для двукратного уменьшения количества частиц, задается следующим выражением:

$$t_{0,5} = \frac{\pi\eta d^3}{8kT\phi}, \tag{13.18а}$$

где ϕ — объемная доля частиц. При комнатной температуре для частиц в воде $t_{0,5} = d^3/10\phi$ с, где d выражено в мкм. Таким образом, если d = 1 мкм, а ϕ = 0,1, то $t_{0,5}$ = 1 с, то есть агрегация будет происходить очень быстро.

В большинстве практических ситуаций агрегация происходит намного медленнее, поскольку значение W зачастую велико. Величина коэффициента устойчивости в основном определяется коллоидным отталкиванием частиц (см. раздел 13.3). Например, для увеличения времени $t_{0,5}$ с 1 с до 4 мес. потребуется значение W порядка 10^7

Непосредственно использовать уравнение (13.18) для прогнозирования стабильности пищевых систем удается очень редко, поскольку существуют многочисленные трудности, в числе которых наиболее важными являются следующие:

- обычно невозможно прогнозировать значение W;
- коэффициент устойчивости может меняться со временем (примером является ферментативный гидролиз групп $—COOCH_3$ у пектина до групп $—COO^-$, которые затем в присутствии ионов Ca^{2+} могут образовать мостики);

- существуют другие механизмы столкновения, обусловленные перемешиванием или седиментацией; агрегация может принимать различные формы, приводящие к коалесценции (например, капель жира) или к образованию агрегатов.

Тем не менее, применение теории агрегации во многих случаях возможно и полезно, однако здесь мы ее не рассматриваем из-за слишком большой сложности (см. работы [9, 83, 85]).

В зависимости от природы сил взаимодействия между агрегированными частицами (см. раздел 13.3.3) можно добавлять вещества, вызывающие их дезагрегацию, например, для стабилизации пищевого продукта, а также для определения природы этих сил в лабораторных условиях. Следует иметь в виду, что часто действовать могут силы нескольких типов. Растворение водой может вызвать дезагрегацию вследствие:

- снижения осмотического давления (если основной причиной агрегации было деплетивное взаимодействие);
- снижения ионной силы (усиление электростатического отталкивания);
- повышения качества растворителя (увеличение стерического отталкивания).

Электрическими силами также можно манипулировать путем изменения значения pH. Мостики из двухвалентных катионов зачастую можно разрушить добавлением хелирующего вещества, например, *EDTA*, а мостики из адсорбированных полимеров или белков — путем добавления соответствующего низкомолекулярного ПАВ (см. раздел 13.2.2). Реверсирование определенных взаимодействий (например, мостиков —S—S—) требует применения соответствующих реагентов. Кроме того, на стабильность агрегатов при изменении качества растворителя может влиять изменение температуры.

Если силы взаимодействия между частицами в агрегате не очень велики, то дезагрегировать их можно усилиями сдвига, которые создают напряжение $\eta \cdot \nabla v$, где ∇v — градиент скорости (скорость сдвига). В воде для создания напряжения сдвига, равного 1 Па, необходимо $\nabla v = 10^3 с^{-1}$, которое не кажется очень большим. Тем не менее, напряжения сдвига, возникающие при перемешивании и течении, часто достаточны для (частичного) разрушения крупных агрегатов.

Еще одним аспектом является возможное укрепление связей после агрегации (здесь лучше говорить о *соединениях* частиц, так как любое такое соединение может представлять много (например, до ста) отдельных связей). Механизмов укрепления связей может быть несколько [83].

Агрегация частиц в жидких пищевых продуктах зачастую нежелательна, так как может привести к неоднородности продукта, поскольку агрегация значительно усиливает седиментацию или вызывает коалесценцию капель эмульсии. В других случаях требуется слабая агрегация, вызывающая образование пространственной сетки агрегированных частиц и, следовательно, (слабого) геля (см. раздел 13.5.1.5). При этом частицы иммобилизуются и не осаждаются (или осаждаются очень медленно). Примерами могут служить частицы какао в шоколадном молоке, а также клетки и фрагменты растительных тканей в соевом молоке (см. далее рис. 13.16 и 13.19).

13.5. «Полутвердые» продукты

Многие пищевые продукты представляют собой «мягкие» изделия — например, хлеб, маргарин, арахисовое масло, томатный кетчуп, сыр и т. п. Иногда их называют «полутвердыми» продуктами, но оба эти термина неточны. Они исключают пищевые продукты, которые легко текут, а также истинные твердые вещества, то есть пищевые продукты, которые под воздействием силы рук проявляют только упругую (то есть полностью обратимую) деформацию. Практически все полутвердые продукты представляют собой композиционные материалы, то есть они неоднородны на мезо- или даже на макроскопическом уровне. Основные структурные классы таких веществ перечислены ниже.

Гели характеризуются преобладанием жидкости («растворителя») и присутствием непрерывного матрикса взаимосвязанного вещества. Эта пространственная структурная сетка обеспечивает твердотельный характер продукта.

Плотноупакованные системы, в которых наибольшую объемную долю составляют деформируемые частицы, вследствие чего они в некоторой степени деформируют друг друга. Промежуточным веще-

ством является жидкость или (в некоторых случаях) слабый гель. Примерами могут служить овощные пюре (в том числе томатный кетчуп), концентрированные эмульсии (в том числе майонез) и пены с полиэдрическими (многогранными) ячейками (например, пивная пена). К этому классу относятся и концентрированные крахмальные клейстеры, состоящие из набухших, частично клейстеризованных крахмальных зерен — когда зерна разрушаются, образуется очень вязкий макромолекулярный «раствор».

Клеточные материалы. К этому классу относятся большинство овощных и фруктовых тканей. Они характеризуются соединенными, довольно жесткими клеточными стенками, внутри которых находится вещество со свойствами жидкости.

Этой классификации соответствуют не все «полутвердые» вещества. Мясо, например, имеет волокнистое строение. Кроме того, встречаются и промежуточные типы веществ. В этой главе мы сосредоточимся в основном на гелях.

13.5.1. Гели

13.5.1.1. Структура гелей

В основе классификации гелей могут лежать различные классификационные признаки, но для пищевых гелей основой деления на разные типы является структура отдельных фрагментов и полимерных сетей (рис. 13.15).

Полимерные гели. Матрикс состоит из молекул с длинными линейными цепями, каждая из которых в различных местах цепочки поперечно сшита с другими молекулами. Такие гели подразделяют по природе поперечных сшивок на гели с ковалентными сшивками (рис. 13.15, *a*) и физическими (нековалентными) поперечными сшивками. В пищевых гелях преобладают последние (например, солевые мостики, микрокристаллические области (рис. 13.15, *b*) или переплетения того или иного вида (см. разделы 13.5.3.1—13.5.3.2). Другое деление основано на гибкости цепочек между поперечными сшивками — они могут быть очень гибкими (в желатиновых гелях) или довольно жесткими (в большинстве полисахаридных гелей).

Гели из частиц представлены на рис. 13.15, *c*. По сравнению с полимерными гелями в большинстве случаев структурные сетки гелей из частиц намного грубее (у них более крупные поры). Такие гели подразделяют на гели из твердых частиц (например, кристаллов триацилглицеринов в пластичных жирах), и гели из деформируемых частиц (например, мицелл казеина в различных молочных гелях; примером может служить йогурт с ненарушенным сгустком).

Физические поперечные сшивки между полимерными молекулами, как и области контакта между частицами, лучше называть не «связями», а именно «сшивками», так как в такой сшивке участвует, как правило, много отдельных связей (от 10 до 100). Кроме того, связи

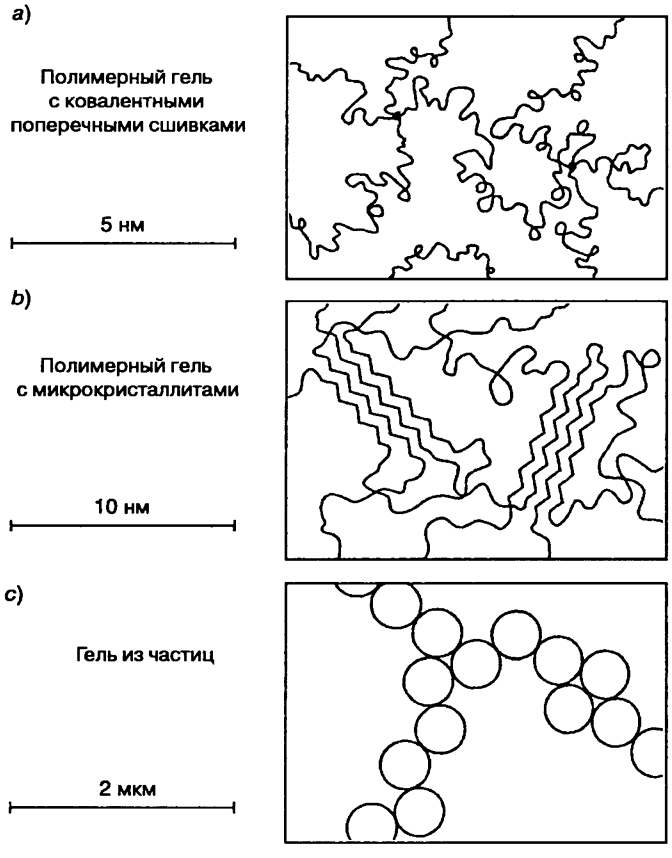


Рис. 13.15. Схематическая иллюстрация трех типов структуры гелей. Жирными точками на рис. *a* обозначены поперечные сшивки. Обратите внимание на разницу в масштабе. По Walstra P. *Physical Chemistry of Foods.* — NY: Marcel Dekker, 2003.

в одной сшивке могут иметь различную природу (Ван-дер-Ваальсовы, электростатические, гидрофобные и водородные связи). Некоторые белки могут также поперечно сшиваться ковалентными связями (например, межмолекулярными связями —S—S—).

Гелеобразование может индуцироваться различными способами в зависимости от типа гелеобразователя. При этом различают следующие типы гелей.

Гели холодного гелеобразования, которые формируются после нагревания до температуры, при которой образующий сетку материал растворяется или образует дисперсию очень мелких частиц. При последующем охлаждении в результате образования физических поперечных сшивок образуется гель. Примерами таких гелеобразователей могут служить желатин, к-каррагинан, смеси камеди рожкового дерева (КРД) и ксантана, а также пластичные жиры. В случае полимерных гелей охлаждение зачастую сопровождается конформационным преобразованием молекул, образующих пространственную сетку (например, у к-каррагинана);

Гели горячего гелеобразования. При нагревании раствора глобулярных белков выше их температуры денатурации гель может образоваться, если концентрация белков выше критического значения c_0; обычно такие гели необратимы, и их прочность после охлаждения значительно возрастает. Величина c_0 зависит от типа белка, физико-химических условий и скорости нагревания. Примерами таких гелеобразователей могут служить яичный белок, изолят соевого белка (ИСБ), сывороточные белки и белки мяса. Кроме того, при высокой температуре некоторые химически модифицированные полисахариды могут образовать обратимые гели. Это относится, главным образом, к некоторым эфирам целлюлозы (например, к метилцеллюлозе, которая содержит группы $-OCH_3$, образующие при высокой температуре гидрофобные связи).

Некоторые гели образуются при изменении условий, влияющих на молекулярные или коллоидные взаимодействия, — значения pH, ионной силы, концентрации определенных солей (например, ионов Ca^{2+}) или действия фермента. Примерами служат сычужные и кисломолочные гели (гели, образующиеся при введении в молоко соответственно сычужного фермента или кислоты) и холодное гелеобразование путем изменения значения pH дисперсии термически образованных агрегатов глобулярного белка (например, β-лактоглобулина или яичного альбумина).

13.5.1.2. Реологические характеристики

Большинство прикладных и пищевых свойств гелей в значительной мере определяется их механическим поведением (см. раздел 13.5.2). Для лучшего понимания этих аспектов рассмотрим некоторые основные механические свойства гелей.

С реологической точки зрения гель — это материал преимущественно с упругим поведением в течение рассматриваемого масштаба времени и относительно небольшим модулем (менее 10^7 Па) по сравнению с истинными твердыми телами. Модуль определяется как отношение напряжения (σ/сила/площадь), действующего на материал, к вызванной им относительной деформации (ε) при условии, что отношение σ/ε не зависит от ε. Это условие обычно предполагает малые деформации. Упругость означает, что материал под действием приложенного напряжения мгновенно деформируется, причем относительная деформация остается постоянной, а после снятия напряжения материал немедленно возвращается к своей первоначальной форме (см. пунктирную линию на рис. 13.16, *а*).

Вместе с тем деформация многих гелей происходит не мгновенно: после начальной упругой деформации материал под действием напряжения постепенно деформируется еще больше (см. рис. 13.16, *а*). После снятия напряжения гель не возвращается к своей первоначальной форме, и остаточная деформация со временем приложения напряжения увеличивается. Таким образом, гель демонстрирует упругое и вязкое поведение (его называют вязкоупругим). Желатиновый и к-каррагинановый гели при температурах значительно ниже их точек гелеобразования проявляют, главным образом, чисто упругие свойства, тогда как сычужный и кисломолочные гели являются явно вязкоупругими.

При большом напряжении (в случае некоторых гелей, а также в зависимости от скорости увеличения напряжения) гель может разрушиться или начать течь. *Разрушение* означает, что образец под приложенным напряжением разламывается (обычно на несколько частей). Если материал в широких порах содер-

жит большое количество растворителя, то пространство между частями может сразу заполниться растворителем (например, в случае разрезания сычужного геля при изготовлении сыра). *Текучесть при сдвиге* означает, что гель начинает течь, но масса при этом остается связанной (когерентной) (см. рис. 13.16, *b*). Примерами гелей, которые текут при сдвиге, являются сливочное масло, маргарин и большинство джемов, тогда как желатиновые, агаровые и каппа-каррагинановые гели разрушаются.

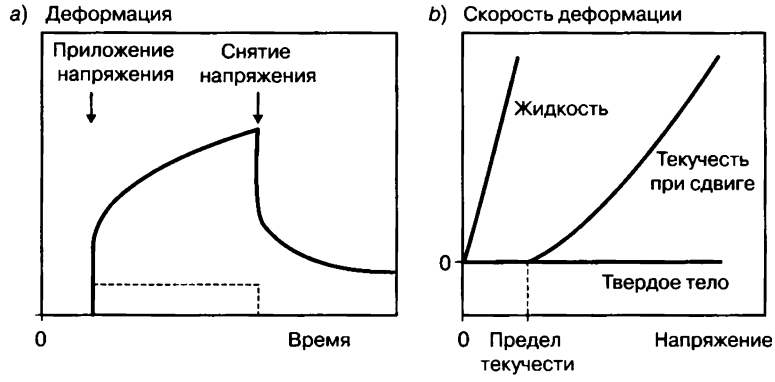


Рис. 13.16. Вязкоупругие свойства: *a* — пример зависимости (относительной) деформации от времени воздействия данного напряжения на вязкоупругий материал, а также после снятия напряжения; пунктирной линией обозначено напряжение ниже предела текучести данного материала; *b* — скорость относительной деформации как функция напряжения для ньютоновской жидкости, полутвердого тела с пределом текучести и упругого твердого тела

Механические свойства гелей существенно различаются. На рис. 13.17, *a* приведена гипотетическая кривая «напряжение–деформация», заканчивающаяся в точке, в которой происходит разрушение. Модуль материала G, также называемый *жесткостью*, равен напряжению, деленному на относительную деформацию (при условии постоянства этого частного; данное условие, как правило, выполняется только для малых относительных деформаций, составляющих обычно менее 1%). *Прочность* материала, в основном, связана с разрушающим напряжением σ_{fr}, а не с этим модулем. Термины *firmness* (твердость, плотность), *hardness* (твердость) и *strength* (прочность) зачастую путают и используют неразборчиво, но органолептический показатель обычно коррелирует с разрушающим напряжением. При сравнении гелей, полученных при различных концентрациях, модуль и разрушающее напряжение не обязательно хорошо коррелируют друг с другом (см. рис. 13.17, *b*). Зачастую добавление к гелеобразующему материалу инертных частиц («наполнителей») увеличивает модуль, но уменьшает разрушающее напряжение [40]. Частично это объясняется тем, что модуль преимущественно определяется числом и силой сшивок в геле, тогда как характеристики разрушения больше обусловлены присутствием больших неоднородностей.

Свойства гелей, описываемые как «хрупкость» (*shortness*) и «ломкость» (*brittleness*), тесно связаны с обратной величиной разрушающей деформации (ε_{fr}). Последняя может варьировать в широких пределах. Для желатина ε_{fr} равна примерно 3, а для некоторых полисахаридных гелей не превышает 0,1. Для гелей из рис. 13.15, *a* и *b* ε_{fr} существенно зависит от длины и жесткости цепочек между поперечными сшивками.

Другим параметром является «*toughness*» («сопротивление разрушению»). Он связан с работой разрушения W_{fr}, а его численное значение равно площади под кривой на рис. 13.17, *a* и выражается в Дж/м^3.

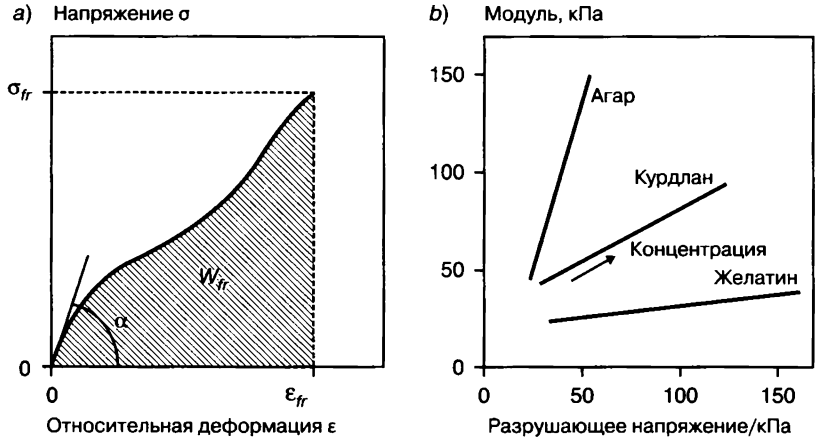


Рис. 13.17. Большая деформация: *a* — гипотетический пример зависимости между напряжением и относительной деформацией при деформации полутвердого тела до его разрушения; модуль равен tg α. W_{fr} обозначает работу разрушения; *b* — зависимость между модулем и разрушающим напряжением для гелей из различных материалов при различных концентрациях; курдлан — это бактериальный полимер β-1,3-глюкана. По [34]

13.5.1.3. Модуль

При малых деформациях гели могут характеризоваться модулем, для которого мы приведем лишь очень общее описание, основанное на упрощенной модели геля. В этой модели гель строится из поперечно сшитых

нитей. Нить может состоять из полимерной цепочки или цепочки агрегированных частиц. Сила, приложенная к такой цепочке, вызывает в ней противодействующую силу, пропорциональную деформации Δx, умноженной на производную силы взаимодействия f от расстояния x между поперечными сшивками, df/dx. При умножении обеих сторон уравнения на N (количество передающих напряжение нитей на единицу поперечного сечения) получается следующее выражение:

$$\sigma = -N\frac{df}{dx}\Delta x. \tag{13.19}$$

Локальное изменение расстояния можно пересчитать в макроскопическую деформацию ε делением Δx на характеристическую длину C, которая определяется геометрией сети (расчет c довольно сложен, и здесь мы его не приводим). Так как f обычно можно представить как производную свободной энергии Гиббса F от расстояния x, получаем:

$$\sigma = CN\frac{d^2F}{dx^2}\varepsilon. \tag{13.20}$$

Так как $G = \sigma/\varepsilon$, а $dF = dH - TdS$ (где H — энтальпия, а S — энтропия), получаем следующее выражение для модуля:

$$G = CN\frac{d^2F}{dx^2} = CN\frac{d(dH - TdS)}{dx^2}. \tag{13.21}$$

13.5.1.4. Полимерные гели

Деформация геля с длинными и гибкими полимерными цепочками между поперечными сшивками приводит, в основном, к изменению конформации этих цепочек с уменьшением энтропии сети. Это означает, что энтальпийным членом в уравнении (13.21) можно пренебречь. В гелях с жесткими полимерными цепочками между поперечными сшивками деформация вызывает также изменение энтальпии, так как химические связи в цепочках изгибаются или растягиваются. К этой категории относится большинство полисахаридных гелей, и для некоторых из них изменением энтропии можно даже пренебречь.

Следует также отметить, что при выводе уравнения (13.21) неявно предполагается, что свойства всех нитей одинаковы. Это условие обычно не выполняется, в том числе и потому, что поперечные сшивки зачастую имеют разную форму, причем количество и сила связей в сшивке могут существенно варьировать. Тем не менее, в простом случае, изображенном на рис. 13.15, *а* (химические поперечные сшивки и длинные гибкие цепочки), уравнение (13.21) можно свести к очень простому выражению для модуля:

$$G = \nu kT, \tag{13.22}$$

где ν — число цепочек между поперечными сшивками в единице объема.

Это уравнение дает достаточно точное значение модуля для очень малых деформаций при том условии, что ν не зависит от температуры и других переменных (pH, ионной силы, качества растворителя в ходе гелеобразования).

Путем применения теорий перколяции для модуля полимерных гелей были получены простые степенны́е зависимости от концентрации структурообразующего материала c, например [65]:

$$G \propto (c - c_0)^n, \tag{13.23}$$

где показатель степени n меняется, в основном, от 2 до 4 в зависимости от структуры пространственной сетки.

Для гелеобразования существует некоторая минимальная концентрация c_0, но физическая трактовка ее значения отсутствует. Эти значения зависят от природы структурообразующего вещества и от физико-химических условий процесса гелеобразования. Во многих случаях соотношение (13.23) хорошо согласуется с экспериментальными данными.

13.5.1.5. Гели из частиц

Эти гели образуются в результате агрегации частиц, взаимное притяжение которых обеспечивается, например, изменением значения pH, ионной силы или качества растворителя. Структура образованны́х

агрегатов имеет, как правило, фрактальную природу [92]. Когда «притягивающиеся» частицы случайно сталкиваются, они образуют небольшие агрегаты (сначала дуплеты), которые при столкновении с другими агрегатами преобразуются в еще более крупные. Это явление называется агрегацией кластеров. Существует простая зависимость между средним числом частиц N_p в агрегате и радиусом R агрегата:

$$N_p = \left(\frac{R}{r}\right)^D \tag{13.24}$$

где r — радиус основных частиц; D — это константа со значением < 3 (ее называют фрактальной размерностью); поскольку она меньше 3, крупные агрегаты более разрежены, чем мелкие.

Средняя объемная доля частиц в агрегате определяется согласно уравнению:

$$\phi_{agg} = \frac{N_p}{N_m} = \frac{(R/r)^D}{(R/r)^3} = (R/r)^{D-3} \tag{13.25}$$

где N_m — количество основных частиц в плотноупакованной сфере радиуса R.

Так как $D < 3$, ϕ_{agg} с увеличением R уменьшается до тех пор, пока она не станет равной объемной доле основных частиц в системе ϕ.

Затем в агрегаты будут включены все частицы, которые заполнят систему. Между агрегатами формируется сшивки с образованием пространственной структурной сетки (то есть геля). Критический радиус агрегатов в точке гелеобразования задается выражением

$$R_g = r\phi^{1/(D-3)}. \tag{13.26}$$

Этот механизм подразумевает, что гель будет образовываться при любом сколь угодно малом значении ϕ. Тем не менее, при очень малом значении ϕ гель будет слишком слабым и потому незаметным, и при слабом перемешивании он будет легко разрушаться. Более того, перед тем как гель сможет образоваться, возможна седиментация агрегатов. Она происходит с большей вероятностью при меньших значениях ϕ, и следовательно, существует некоторая критическая для гелеобразования концентрация ϕ_0.

Зачастую приходится сталкиваться с той проблемой, что вскоре после образования небольших агрегатов происходит перестройка частиц (рис. 13.18). Частицы могут «перекатываться» по другим частицам до тех пор, пока они не образуют сшивки с более чем одной другой частицей. Фрактальная природа агрегатов сохраняется, но в уравнениях вместо r должен использоваться больший «эффективный» радиус r_e. Кроме того, вследствие более быстрой седиментации небольших агрегатов значение ϕ_0 также будет больше.

Теория фрактальной агрегации позволяет вывести степенные законы для реологических характеристик образующегося геля. Предполагается, что модуль геля полностью определяется изменением энтальпии при деформации. Считается также, что фрактальные структуры в среднем «самоподобны», а это означает, что количество сшивок (или соединений) между соседними агрегатами не зависит от их радиуса. Поверхность контакта между агрегатами в сформированном геле будет пропорциональна R_g^2. Соответственно, количество сшивок между агрегатами на единицу поперечного сечения геля пропорционально R_g^{-2} и, следовательно, числу передающих напряжение нитей N в уравнении (13.21). С учетом этого зависимость модуля от ϕ будет иметь следующий вид:

$$G \propto C\frac{d^2H}{dx^2}\phi^{2/(3-D)} \tag{13.27}$$

Зачастую $D \approx 2{,}2$; следовательно, модуль G пропорционален при-

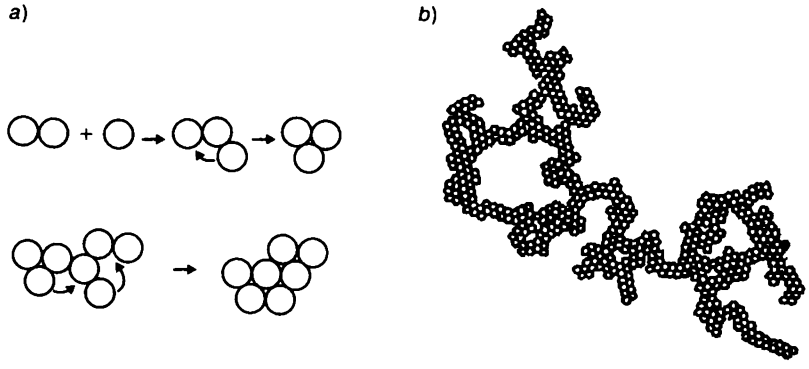


Рис. 13.18. Кратковременная перестройка фрактальных агрегатов: *a* — примеры «перекатывания» частиц по другим частицам с увеличением координационного числа; *b* — пример фрактального агрегата в двух измерениях, в котором произошла определенная кратковременная перестройка. По Walstra P. *Physical Chemistry of Foods.* — NY: Marcel Dekker, 2003.

мерно $\phi^{2,5}$ Так как c может зависеть от ϕ, возможны как более слабые, так и более сильные зависимости G от ϕ [46].

В заключение следует сказать, что хотя гели из частиц кажутся довольно неупорядоченными структурами, для описания их различных свойств вполне можно использовать простые степенные законы (см. также уравнение 13.29).

13.5.2. Функциональные свойства гелей

Технологи-пищевики в большинстве случаев приготавливают гели целенаправленно для получения определенной консистенции или обеспечения физической стабильности продукта. Требуемые свойства гелей и способы их достижения приведены в табл. 13.5 и 13.6.

Таблица 13.5
Консистенция гелей: механические параметры гелей, обеспечивающие формирование заданных свойств

Требуемое свойство	Значимые параметры	Значимые условия
Стойкость	Предел текучести	Масштаб времени
Твердость	Разрушающее напряжение или предел текучести	Масштаб времени, относительная деформация
Способность принимать нужную форму [a]	Предел текучести + время для восстановления формы	Различные
Удобство обращения и нарезания	Разрушающее напряжение, работа разрушения	Скорость относительной деформации
Ощущения во рту	Текучесть при сдвиге и характеристики разрушения; жесткость	Скорость относительной деформации
Прочность (например, пленки)	Характеристики разрушения	Напряжение, масштаб времени

[a] После приготовления геля.

Таблица 13.6
Свойства геля, необходимые для обеспечения физической стабильности

Требуется предотвратить или затруднить	Необходимое свойство геля
Движение частиц:	
седиментацию	Высокая вязкость или значительный предел текучести + короткое время восстановления
агрегацию	Высокая вязкость или значительный предел текучести
Локальные изменения объема:	
созревание Оствальда	Очень большой предел текучести
Движение растворителя:	
утечку	Небольшая проницаемость + значительный предел текучести
конвекцию	Большая вязкость или значительный предел текучести
Движение растворенного вещества:	
диффузию	Очень небольшая проницаемость, высокая вязкость растворителя

Несмотря на то что *консистенцию* мы уже вкратце рассматривали, информация, содержащаяся в табл. 13.5, является очень важной, поскольку тип реологических измерений и их масштаб времени, а также используемая скорость относительной деформации должны соответствовать поставленной цели. Например, для оценки стабильности формы, то есть способности куска геля (например, пудинга) сохранять свою форму под действием собственного веса, измерение модуля не имеет никакого смысла. Адекватным экспериментом может быть простое наблюдение за конкретным куском и, возможно, измерение высоты образца, который только начинает течь. Чтобы обеспечить свойство сохранения формы, предел текучести должен быть больше $g \times \rho \times H$, где H — высота образца. Для куска высотой 10 см он будет около

9,8 10^3 0,1 = 10^3 Па. Следует также иметь в виду, что при более длительном масштабе времени предел текучести зачастую будет меньше.

Очень *слабые гели* вкратце рассматривались в разделе 13.4.3. В повседневной жизни такая система кажется жидкой, так как если ее предел текучести меньше примерно 10 Па, то она легко вытекает из бутылки; тем не менее при очень малых напряжениях система обладает упругими свойствами. Такой небольшой предел текучести может быть достаточным для предотвращения седиментации. Хорошим примером может служить соевое молоко (рис. 13.19).

В соевом молоке содержатся небольшие частицы, состоящие из фрагментов клеток и органелл. Эти частицы агрегируются, образуя слабый обратимый гель. При правильных условиях обработки предел текучести достаточен для предотвращения седиментации этих и даже более крупных частиц. Кроме того, небольшой предел текучести могут иметь некоторые смеси полисахаридов (например, растворы ксантановой камеди и КРД), даже очень разбавленные (см. рис. 13.14, кривая *3*). Этот предел текучести способен предотвратить седиментацию любых присутствующих частиц [41].

Проницаемость. Иногда бывает желательно остановить движение жидкости, для чего необходимым параметром является проницаемость геля. Согласно закону Дарси поверхностная скорость движения жидкости v через пористый матрикс равна:

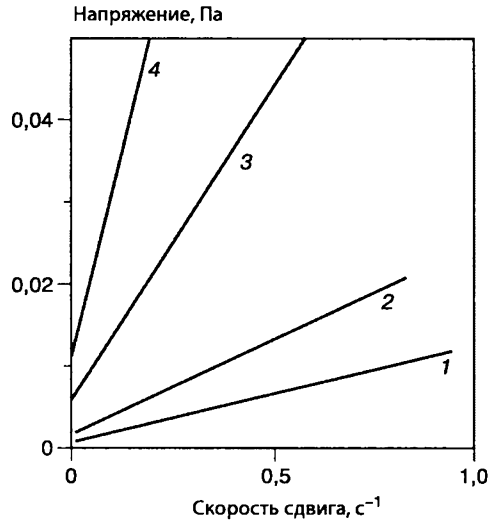


Рис. 13.19. Кривые течения (зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига) соевого молока. Пределы текучести задаются пересечением кривых с осью *y*. Соевое молоко приготавливалось из лущеных (кривые *1* и *2*) или цельных соевых бобов (кривые *3* и *4*) путем его сбора в течение ночи при комнатной температуре (1 и 3) или в течение 4 ч при 60 °С (*2* и *4*). По [54]

$$v \equiv \frac{Q}{A} = \frac{B}{\eta}\frac{\Delta p}{x}, \tag{13.28}$$

где Q — объемная скорость течения ($м^3/с$) через площадь поперечного сечения A; Δp — перепад давления на расстоянии x; проницаемость B ($м^2$) является константой материала, которая значительно варьирует в случае гелей.

Проницаемость геля из частиц типа молока, свернутого сычужным ферментом и состоящего из мицелл *пара*-казеина, составляет порядка 10^{-12} $м^2$, тогда как полимерный гель (например, желатиновый) обычно имеет значение B порядка 10^{-17} $м^2$. В последнем случае утечка жидкости из геля будет пренебрежимо медленной.

Для фрактальных гелей из частиц можно вывести простой степенной закон для проницаемости:

$$B = \frac{r_c^2}{K}\phi^{2/(D-3)}, \tag{13.29}$$

где K — коэффициент пропорциональности, значение которого зачастую находится в диапазоне от 50 до 100; показатель степени для ϕ хорошо согласуется с экспериментальными данными [92].

Перемещение растворенного вещества через жидкость в геле должно осуществляться диффузией, поскольку конвекция, как правило, невозможна. Коэффициент диффузии D не сильно отличается от такового в растворе (по крайней мере, для небольших молекул в не очень концентрированном геле). Формула Стокса для коэффициента диффузии ($D = kT/6\pi\eta r$, где r — радиус молекулы) применяться не может. Здесь важна не макроскопическая вязкость системы, а вязкость, ощущаемая диффундирующими молекулами, то есть вязкость растворителя. С другой стороны, растворенное вещество должно диффундировать мимо нитей гелевого матрикса, и это препятствие в случае крупных молекул и мелких пор между нитями в геле будет больше (рис. 13.20).

Дополнительными свойствами гелей являются набухание и синерезис. Последний противоположен набуханию и означает выдавливание жидкости из геля. Общих правил проявления этих свойств не суще-

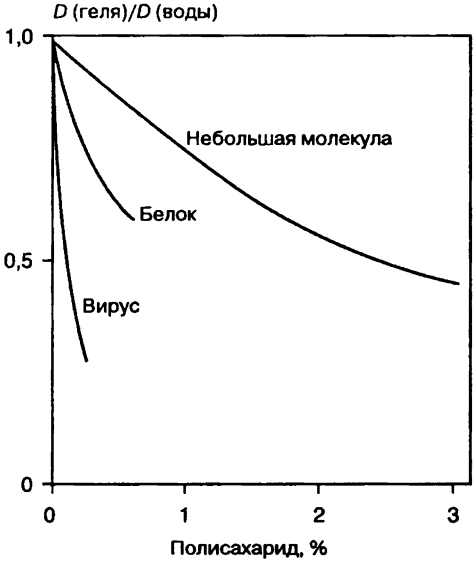


Рис. 13.20. Диффузия растворенных веществ в полисахаридных гелях различной концентрации. D — коэффициент диффузии. Адаптировано из работы [30]

ствует. В полимерном геле синерезис могут вызвать снижение качества растворителя (например, при изменении температуры), внесение соли (в случае полиэлектролитов) или увеличение числа поперечных сшивок или соединений, однако поскольку перепад давления в уравнении (13.28) и значение B обычно очень малы, то синерезис или набухание протекают обычно очень медленно. В гелях из частиц синерезис может происходить намного быстрее из-за значительно большей проницаемости. Известно, что молоко, свернутое сычужным ферментом, предрасположено к синерезису, являющимся необходимой производственной стадией в сыроделии. Учет сочетания переменных, влияющих на синерезис, очень сложен [75].

13.5.3. Некоторые пищевые гели

Далее мы попытаемся прояснить рассмотренные выше теоретические моменты на примере пищевых гелей.

13.5.3.1. Полисахариды

Несмотря на широкое разнообразие типов полисахаридов (см. главу 3), существуют некоторые общие правила, определяющие свойства полисахаридных гелей [48]. Большинство цепочек полисахаридов довольно жесткие, и одной из причин этого может быть присутствие на основной цепи нескольких крупных боковых групп. Обычно существенный изгиб сегмента цепи происходит тогда, когда его длина превышает примерно 10 мономеров (моносахаридных остатков). Благодаря этому полисахариды могут давать весьма вязкие растворы: так, 0,1% ксантана повышает вязкость воды не менее чем в 10 раз. Некоторые полисахариды способны к гелеобразованию. Вообще говоря, поперечные сшивки геля — это стыковые зоны, каждая из которых содержит большое количество (слабых) связей и вовлекающие довольно большую часть материала. Это означает, что нити между поперечными сшивками не очень длинные. В сочетании с жесткостью цепи это приводит к образованию довольно ломких (и даже хрупких) гелей. Фактически они занимают промежуточное положение между энтропийными и энтальпийными гелями (см. уравнение 13.21). Естественно, в этом отношении полисахариды проявляют большую вариативность.

Поперечные сшивки между молекулами полисахаридов могут быть разных типов.

- *Микрокристаллические блоки* (тип 1). Этот простейший тип с локальной укладкой растянутых сегментов изображен на рис. 13.15, *b*. Он редко встречается у гелеобразующих полисахаридов, хотя нативная целлюлоза представляет пример почти полностью кристаллизованного линейного полимера. Амилоза не может образовывать линейные цепи, но блоки из одиночных спиралей амилозы предположительно могут образовывать в растворах микрокристаллические области, и при достаточно высокой концентрации амилозы происходит гелеобразование. Подобное поведение наблюдается и у амилопектина. Эти явления участвуют в «ретроградации» клейстеризованного крахмала. Микрокристаллические блоки могут также образоваться из других структурных элементов (см. ниже).
- *Двойные спирали* (тип 2). Некоторые полисахариды (например, каррагинаны, агар и геллановая камедь) могут образовать двойные спирали ниже строго определенной температуры, зависящей от конкретных условий. Каждая спираль обычно состоит из двух молекул, но они могут образоваться только в так называемых «неволосистых» областях полимера (то есть в областях, лишенных объемных боковых групп). Таким образом, такие двойные спирали являются поперечными связями, приводящими к гелеобразованию. Вместе с тем образование спирали происходит обычно очень быстро (в течение миллисекунд), тогда как гелеобразование занимает значительно больше времени (несколько секунд). Такие двойные спирали на самом деле образуют микрокристаллические блоки (по меньшей мере, в каппа-каррагинане, который предположительно их стабилизирует, см. рис. 13.21, *a*). Как только

Соединения типа «лотка для яиц» (тип 3) встречаются у некоторых заряженных полисахаридов (например, в альгинате) в присутствии двухвалентных катионов (рис. 13.21, *c*). Альгинат имеет отрицательные заряды, которые зачастую располагаются на регулярных расстояниях друг от друга, что позволяет двухвалентным катионам типа Ca^{2+} образовывать мостики между двумя параллельными молекулами полимера, и в результате образуются довольно жесткие сшивки. По всей вероятности, эти сшивки затем упорядочиваются в виде микрокристаллических областей. При температурах ниже 100 °С такие сшивки почти не «плавятся».

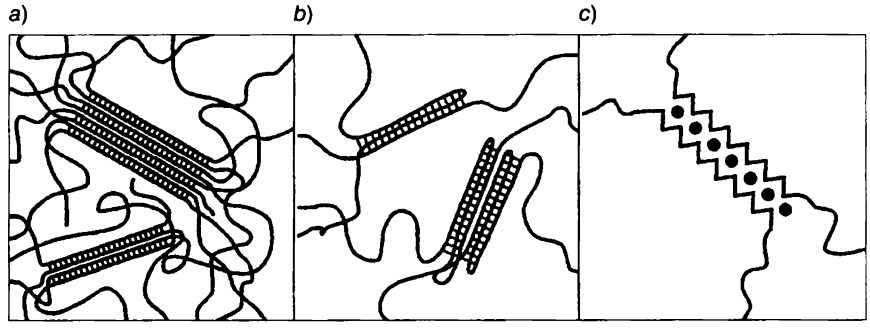


Рис. 13.21. Схематическое представление различных типов сшивок в полимерных гелях: *a* — многорядные двойные спирали (например, у каррагинанов); *b* — тройные спирали у желатина; *c* — соединение типа «лотка для яиц» у альгината; точками обозначены ионы кальция, а спиральные структуры обозначены штриховкой

На свойства полисахаридных гелей и гелеобразование могут влиять разные факторы, в том числе молекулярная структура, молярная масса (рис. 13.22, *b*), концентрация (рис. 13.22, *a* и *b*), температура (рис. 13.23, *b*), качество растворителя, а в случае полиэлектролитов — значение pH и ионная сила (рис. 13.23, *b*).

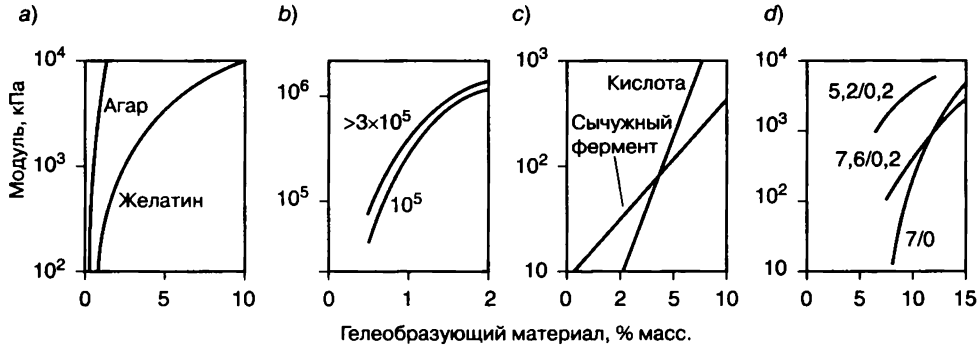


Рис. 13.22. Влияние концентрации гелеобразующего материала на модуль сдвига гелей: *a* — агар и желатин; *b* — каппа-каррагинан двух (указанных) молярных масс в 0,1%-ном растворе KCl; *c* — казеиновые гели, полученные путем медленного скисания или сычужного свертывания молока; *d* — ИСБ-гели тепловой желатинизации (цифры у кривых соответствуют значению pH/количеству внесенного хлорида натрия, по молярной массе)

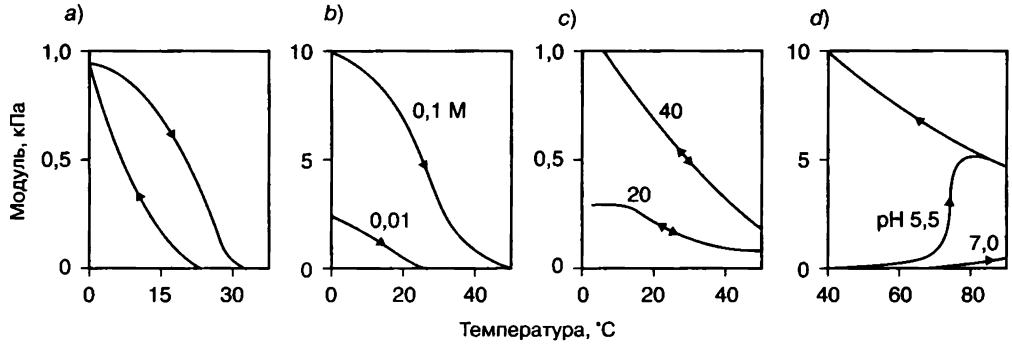


Рис. 13.23. Влияние температуры на модуль сдвига различных гелей (стрелками показано направление изменения температуры): *a* — желатин, 2,5%; *b* — каппа-каррагинан (1%) при двух (указанных) концентрациях $CaCl_2$; *c* — кислотные казеиновые гели (2,5%), приготовленные и выдержанные при двух (указанных) температурах; *d* — β-лактоглобулин (10%) при двух (указанных) значениях pH. Кроме того, результаты зависят от скорости нагревания или охлаждения

13.5.3.2. Желатин

Из всех пищевых гелей к идеальному энтропийному гелю наиболее близок желатиновый. Длинные и гибкие молекулярные нити между поперечными сшивками делают этот гель очень растяжимым, а благодаря постоянству поперечных сшивок (по меньшей мере при низкой температуре) он также преимущественно упругий. Вместе с тем, соотношение для модуля (13.22) соблюдается неудовлетворительно. Модуль возрастает пропорционально примерно квадрату концентрации (рис. 13.22, *а*), и температурная зависимость существенно отличается от прогнозной (рис. 13.23, *а*). Эти расхождения обусловлены механизмом перекрестных сшивок. Несмотря на интенсивную обработку коллагена при приготовлении желатина, его молекулы сохраняют значительную часть своей длины и образуют весьма вязкие водные растворы. После охлаждения молекулы имеют тенденцию к образованию тройных спиралей, подобных спиралям пролина в коллагене. Это относится только к части желатина, и спиралевидные области относительно короткие. В отличие от некоторых полисахаридов молекула желатина не может образовывать межмолекулярную двойную спираль. Это обусловлено тем, что пептидные связи не могут вращаться на все 360°, и поэтому образование спирали в одном месте вызовет кручение других частей молекул, которое вскоре прекращается из-за наличия стерического препятствия. Предполагается, что молекула желатина резко перегибается в так называемом β-витке и затем образует короткую двойную спираль. Впоследствии эту спираль обвивает третья нить, тем самым ее завершая. Если эта третья нить является частью другой молекулы, то образуется поперечная сшивка (см. рис. 13.21, *b*). При повышении температуры тройные спирали «плавятся», и из-за этого модуль уменьшается [11, 37].

Фактически механизм гелеобразования несколько сложнее. Существует значительный гистерезис между кривыми охлаждения и нагревания (рис. 13.23, *а*). Кроме того, при охлаждении раствора желатина до температуры ниже, например, 25 °С, модуль может продолжать увеличиваться еще в течение нескольких суток. Это сопровождается увеличением количества спиралевидного материала (примерно до 30% желатина), однако происходит и некоторая структурная перестройка. Степень упаковки тройных спиралей все еще остается вопросом дискуссионным.

В заключение следует отметить, что уникальная зависимость состояния желатинового геля от температуры предоставляет широкие возможности для производства различных пищевых продуктов.

13.5.3.3. Казеиновые гели

Молоко содержит казеиновые мицеллы — белковые агрегаты со средним диаметром около 120 нм, в которых около 10^4 молекул казеина (см. главу 15). Эти мицеллы агрегируются при снижении pH примерно до 4,6 (при этом уменьшаются силы электрического отталкивания) или при добавлении протеолитического фермента, который удаляет части молекул каппа-казеина, выступающие в растворитель (при этом уменьшаются силы стерического отталкивания). Фрактальные гели образуются с фрактальной размерностью около 2,3. Проницаемость, составляющая для средней концентрации казеина (c) около $2 \cdot 10^{-13}$ м^2, сильно зависит от c (она почти пропорциональна c^{-3}). Для казеиновых гелей в соответствии с их фрактальной природой (уравнение 13.27) характерна линейная зависимость между логарифмом модуля и логарифмом концентрации казеина (см. рис. 13.22, *с*). Разные наклоны кривых предполагают некоторые структурные различия. Первоначально изогнутые нити, образующиеся при образованим сычужного геля, вскоре выпрямляются, тогда как нити в кислотных гелях остаются изогнутыми [47].

«Строительные блоки» такого геля, то есть мицеллы казеина, самодеформируются, и сшивки между ними являются гибкими, благодаря чему образуется довольно слабый и мягкий гель. Для кислотных казеиновых гелей разрушающее напряжение составляет около 100 Па, а разрушающая деформация — около 1,1; для сычужных гелей эти значения равны соответственно примерно 10 Па и 3. Таким образом, кислотный гель менее прочный. Эти результаты относятся к медленной деформации (например, более 15 мин); при более быстрой деформации разрушающее напряжение намного больше. Приложение к сычужному гелю напряжения, чуть превышающего 10 Па, вызовет течение (обнаруживаемого предела текучести нет), и через некоторое, весьма продолжительное время произойдет разрушение геля. Напряжения в 100 Па приводит к разрушению уже в течение 10 с. Подобное поведение наблюдается и для некоторых других типов гелей из частиц, но оно отнюдь не универсально.

Все приведенные значения зависят от конкретных условий, особенно от температуры. Из рис. 13.23, *c* видно, что при пониженной температуре модуль казеинового геля больше. Это может показаться странным, так как считается, что главную роль в стабильности геля играют гидрофобные связи между молекулами казеина, а сила этих связей с уменьшением температуры снижается. Предполагают, что уменьшение силы гидрофобных связей (низкое значение *T*) приводит к набуханию мицелл и, следовательно, к увеличению поверхности контакта между соприкасающимися мицеллами, то есть к большему количеству связей в сшивке. И наоборот, повышение температуры гелеобразования дает больший модуль (по меньшей мере для кислотных гелей, см. рис. 13.23, *c*), что обусловлено некоторыми различиями в геометрии сети, а не разными типами сшивок.

При температурах выше 20 °C в сычужных гелях наблюдается синерезис, сопровождающийся перестройкой пространственной сетки частиц, то есть происходит некоторая их дезагрегация. В области, где невозможно вытеснение жидкости (то есть внутри геля), также происходит перестройка с образованием как более плотных, так и менее плотных областей. Это явление называют микросинерезисом, который приводит к увеличению проницаемости и вызывает распрямление нитей сетки [77, 84, 92].

13.5.3.4. Гели из глобулярных белков

Многие хорошо растворимые глобулярные белки при нагревании образуют гель, если концентрация белка выше некоторого критического значения c_0 (см. рис. 13.22, *d*). Такие гели тепловой желатинизации образуются только при условии, что хотя бы часть белков при нагревании денатурируются, а после охлаждения они не возвращаются к нативному состоянию (см. рис. 13.23, *d*). Гелеобразование — процесс относительно медленный, длящийся не менее нескольких минут, так что для достижения максимальной прочности геля может потребоваться значительно больше времени. Белковое гелеобразование включает в себя ряд последовательных реакций: сначала молекулы белка денатурируются, затем денатурированные молекулы агрегируются с образованием почти сферических или удлиненных частиц, после чего эти частицы образуют пространственную структурную сетку. Все эти реакции частично могут происходить параллельно [12, 63, 64].

Процессы гелеобразования и свойства белковых гелей широко варьируют из-за вариативности молекулярного строения и конформационной стабильности белков. Дополнительная сложность связана с тем, что гели тепловой желатинизации обычно приготавливают из смесей белков (например, изолятов сывороточного или соевого белка). В гелеобразовании участвуют —S—S— связи, электростатические, Ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия, а также Н-связи в качестве составляющих межмолекулярные стыковых зон β-нитей.

Структура и, следовательно, реологические свойства таких гелей существенно зависят от значения pH, ионной силы, солевого состава и скорости нагревания. Как правило, с помощью микроскопии различимы два типа структуры гелей, а именно тонко- и крупноскрученные сети. Тонкоскрученные гели прозрачны и состоят из относительно тонких нитей диаметром обычно 10—50 нм, которые ветвятся, образуя сеть. Обычно они образуются при нагревании в условиях pH, существенно отличающихся от изоэлектрической точки, и при низкой ионной силе. Крупноскрученные или гели из частиц (некоторые из них имеют фрактальную сетевую структуру) обычно мутные и строятся из почти сферических частиц размером 0,1—1 мкм. Такие гели, как правило, образуются при нагревании в условиях pH, близких к изоэлектрической точке и/или при высокой ионной силе. Крупноскрученные гели обычно более прочные, чем тонкоскрученные. В обоих типах гелей степень извилистости нитей может значительно варьировать, что приводит к широкому диапазону разрушающих деформаций. Кроме того, белковые гели тепловой желатинизации существенно различаются по проницаемости и, соответственно, по их склонности терять растворитель под давлением в ходе последующей обработки или транспортировки.

Альтернативный процесс получения гелей из глобулярных белков основан на нагревании раствора при таком значении pH, при котором белок денатурирует и образует небольшие агрегаты, но не гель. Гель образуется уже после охлаждения и приближения значения pH к изоэлектрической точке (такое явление известно как «холодное гелеобразование»).

Образование гелеподобной структуры при экструзии можно сравнить с тепловым гелеобразованием глобулярных белков (примером могут служить соевые продукты, богатые белком) [38].

13.5.3.5. Смешанные гели

Очевидно, что структура и свойства гелей существенно варьируют. Модуль 1%-ного геля может различаться почти на пять порядков, а разрушающая деформация — в 100 раз. Почти каждая гелевая система характеризуется специфическими зависимостями, которые зачастую недостаточно изучены.

При рассмотрении смешанных гелей ситуация еще более усложняется. Относительно простыми являются гели, заполненные частицами (например, каплями эмульсии), но их свойства значительно отличаются от свойств незаполненных гелей [10, 40]. Довольно часто используют смесь полисахаридов. Слабое притяжение между полимерами при структурообразующих условиях может приводить к гелеобразованию, даже если эти полимеры сами по себе геля не образуют [10, 49]. Например, разбавленные растворы ксантановой камеди или КРД не показывают регистрируемого предела текучести в отличие от разбавленных смесей, после нагревания и последующего охлаждения которых образуются смешанные сшивки. Другим примером может служить добавление 0,03% каппа-каррагинана в молоко, что приводит к образованию слабого геля (этот способ применяется, например, в производстве шоколадного молока для предотвращения седиментации частиц какао).

Вследствие термодинамической несовместимости двух полимеров может происходить разделение фаз, особенно если концентрации полимеров не очень малы. Например, смешанные растворы хорошо растворимого полисахарида и белка могут разделиться на две фазы — одну, богатую белком, и вторую, богатую полисахаридом [67, 68]. Это происходит, например, в смесях желатина и декстрана (полимера глюкозы, не образующего гель полисахарида). Разделение фаз происходит сразу после смешивания при температуре выше точки гелеобразования желатина; если после разделения фаз непрерывной фазой является раствор желатина, то система после охлаждения замораживается.

Сильное взаимное притяжение между молекулами полимеров может привести к образованию сложного коацервата. Это означает разделение на две фазы — фазу с высокой концентрацией обоих полимеров и фазу с низкой их концентрацией. Это происходит, если полимеры имеют разноименный заряд (например, у β-лактоглобулина и гуммиарабика — при pH 2,5–4,5 и низкой ионной силе).

Составные пищевые продукты значительно сложнее рассматривавшихся нами систем [30]. Тем не менее, знание основных принципов может пригодиться для понимания их поведения и планирования научных экспериментов.

13.5.4. «Ощущение во рту»

Важнейший атрибут качества пищевых продуктов — это их органолептические свойства при употреблении. Пищевые продукты зачастую специально разрабатывают с учетом оптимизации этих свойств, к которым относят вкус и аромат, текстуру и внешний вид [32, 58, 74].

Основное внимание здесь мы уделим органолептическому восприятию структуры продукта в ротовой полости («текстуры»), в том числе консистенции и физической неоднородности. Фактически ротовую полость можно считать своего рода перерабатывающим устройством, в котором продукт перерабатывается, измельчается и транспортируется в пищевод способом, зависящим от механических свойств продукта. Кроме того, в ротовой и связанной с ней носовой полости находятся рецепторы, используемые человеком при оценке оранолептических свойств данного продукта.

Жидкости и «полутвердые» вещества перерабатываются во рту иначе, чем твердые. Жидкости просто транспортируются в пищевод (в основном с помощью языка), тогда как переработка твердых продуктов включает несколько отдельных стадий: 1) раскусывание/проглатывание; 2) разжевывание и увлажнение, включая формирование болюса*; 3) проглатывание болюса и очищение ротовой полости. На каждой такой стадии пищевой продукт деформируется по-разному и с разной скоростью, а также смешивается со слюной. Переработка полутвердых веществ также включает в себя сжатие и усилие сдвига между языком и небом. При такой переработке потребитель начинает оценивать органолептические свойства, включая некоторые показатели текстуры, в частности, консистенцию, шероховатость или гладкость, рассыпчатость и т. д. Некоторые из этих характеристик представляют собой многокомпонентные показатели и состоят

* Здесь — кусок частично пережеванной пищи или жидкость в объеме одного глотка во рту, а также в процессе прохождения до желудка через глотку. — *Примеч. ред.*

из нескольких «подпоказателей», все из которых должны в какой-то степени присутствовать. Например, «сливочность» включает в себя консистенцию и «гладкость» при отсутствии шероховатости (вполне возможно, что на восприятие сливочности влияют также вкус и аромат).

Такая «переработка» в ротовой полости лучше изучена (хотя и в ограниченной степени) для жидкостей и твердых веществ. В результате были выведены некоторые общие правила.

Оценка свойств жидкости в ротовой полости зависит от ее реологических характеристик, лучше всего выражаемых вязкостью как функцией скорости сдвига. Опытным путем установлено, что для маловязких жидкостей (вязкость менее 0,1 Па·с) органолептическая оценка вязкости соответствует инструментальной оценке при напряжении сдвига около 10 Па. Для высоковязких продуктов (более 10 Па·с), органолептическая оценка соответствует инструментальной оценке напряжения при постоянной скорости сдвига 10–20 $с^{-1}$; кроме того, при оценке учитывается размазывающее действие между языком и нёбом. В случае промежуточных значений вязкости основное внимание при оценке придается разным реологическим свойствам. Зачастую единственной органолептической характеристикой принимается консистенция, однако наряду с (кажущейся) вязкостью в оценку, возможно, вовлекаются и другие реологические свойства (по крайней мере, это несомненно для таких продуктов эмульсионной природы, как томатный кетчуп или яблочное пюре).

Для таких маловязких жидкостей, как вода и молоко, течение в ротовой полости может быть локально турбулентным. Для всех жидких и многих пищевых продуктов эмульсионной природы эта скорость течения локально изменяется, и продукт смешивается со слюной. Например, томатный кетчуп и многие продукты в виде гидроколлоидных растворов становятся более жидкими. Этот эффект разжижения в ротовой полости вполне ощутим и связан, по-видимому, с таким показателем текстуры, как «слизистость», но даже этот простейший показатель нельзя приписать какому-то одному реологическому свойству продукта [74]. Для пищевых продуктов, имеющих некоторый предел текучести, ниже которого они не текут, как для многих веществ эмульсионной природы, воспринимаемая консистенция зависит и от величины этого предела текучести. Наконец, сжатие и усилие сдвига между языком и нёбом создают помимо сдвигового течения еще и течение в продольном направлении, и для некоторых веществ, особенно полимерных, вязкость в продольном течении существенно больше «обычной» сдвиговой вязкости.

Влияние температуры на восприятие показателей текстуры, связанных с вязкостью и пределом текучести, относительно невелико. Тем не менее это влияние может быть намного больше при фазовом переходе от исходной температуры пищевого продукта к температуре полости рта (например, плавление кристаллов жира или желатинового геля). Аналогичные изменения могут также происходить под воздействием ферментов. Хотя многие продукты находятся в ротовой полости лишь несколько секунд, за это время может произойти значительное разложение крахмала, зависящее, в том числе, от степени смешивания продукта со слюной.

После проглатывания на языке и в других областях полости рта обычно остается покрытие из остатков пищевого продукта, свойства которого зависят от адгезионных и когезионных свойств продукта как такового и твердых частиц, оставшихся во рту. Это покрытие заметно влияет на оргалоптические ощущения после проглатывания. Так, сцепление (макро)молекул со слоем слизи, покрывающим поверхности полости рта, коррелирует с увеличением таких органолептческих показателей, как «песчанистость» или «терпкость» (вяжущее послевкусие»).

Как мы уже отмечали, можно выделить три стадии «переработки» твердого продукта в ротовой полости. Раскусывание можно имитировать одноосным сжатием между двумя клиньями [78] при соответствующей скорости сжатия. Характеристики больших деформаций для многих пищевых продуктов зависят от скорости деформации. Скорость раскусывания обычно составляет 2–6 см/с. Сопротивление раскусыванию и максимальная его сила, необходимая для разламывания вещества, коррелируют с органолептической оценкой жесткости и твердости, однако при такой оценке учитываются и другие свойства. После раскусывания дальнейшее разрушение пищевого продукта обеспечивается измельчением и усилиями сдвига между коренными зубами. Важную роль в перемещении частиц пищи к коренным зубам и в оценке того, какие частицы достаточно измельчены и увлажнены для последующего проглатывания, играет язык; скорость и относительное значение измельчения и сдвига зависят от типа пищевого продукта (рис. 13.24). Затем пища перемещается к задней части полости рта, где образуется проглатываемый через некоторое

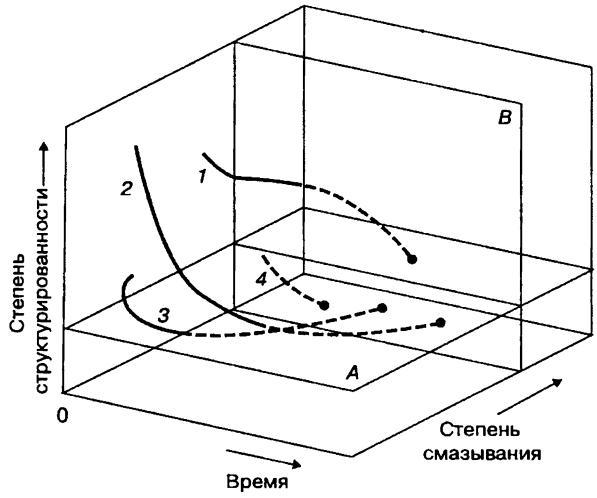


Рис. 13.24. Схематическое представление о траекториях разрушения во рту некоторых пищевых продуктов после употребления (время = 0). Двумя основными рассматриваемыми процессами являются: *a* — разрушение структуры, которое считается достаточным ниже горизонтальной плоскости *A*; *b* — смазывание, которое считается достаточным за вертикальной плоскостью *B*. Переработанный пищевой продукт (болюс) перед проглатыванием должен быть и измельчен, и смазан: *1* — нежное и сочное мясо; *2* — жесткое и сухое мясо; *3* — сухой бисквит (степень смазывания сначала снижается, а затем возрастает); *4* — густая жидкость, например, йогурт с нарушенным сгустком. Пунктиром обозначены линии ниже плоскости *A* и за плоскостью *B*. Момент проглатывания болюса обозначен жирными точками. По [32]

время болюс. Очищение полости рта обеспечивается механическим действием языка, медленной дисперсией или растворением остатков пищи в слюне и ферментативным расщеплением остатков пищевого продукта.

13.6. Эмульсии

13.6.1. Описание

Эмульсии — это дисперсии одной жидкости в другой. Наиболее важными переменными, определяющими свойства эмульсии, являются следующие.

Тип эмульсии, то есть «масло-в-воде» или «вода-в-масле», определяет жидкость, которая может использоваться для разбавления эмульсии (см. раздел 13.1.2). Многие пищевые продукты, в том числе молоко и молочные продукты, соусы, дрессинги и супы, являются эмульсиями типа «масло-в-воде». Едва ли существуют пищевые продукты, которые являются истинными эмульсиями типа «вода-в-масле». Сливочное масло и маргарин содержат капли воды, но они включены в пластичный жир; плавление кристаллической части жира приводит к созданию эмульсии типа «вода-в-масле», которая сразу разделяется с образованием масляного слоя поверх слоя воды. Капли некоторых эмульсий типа «масло-в-воде» также содержат кристаллы жира (по крайней мере, при низких температурах), и поэтому, строго говоря, они не являются эмульсиями в строгом смысле.

Распределение размера капель. Этот показатель имеет большое значение для физической стабильности, причем мелкие капли обычно дают более стабильные эмульсии. Тем не менее, энергия и количество эмульгатора, необходимые для образования эмульсии, с уменьшением размера капель возрастают. Типичный средний диаметр капель эмульсии составляет 1 мкм, но он может быть в интервале от 0,2 до нескольких мкм. Из-за большой зависимости стабильности эмульсии от размера капель очень важен дипазон распределения размеров капель (примеры приведены на рис. 13.25, *a*).

- *Объемная доля дисперсной фазы* (ϕ). В большинстве пищевых продуктов значение ϕ составляет от 0,01 до 0,4. Для майонеза оно может быть равно 0,8, то есть больше значения для максимальной упаковки жестких сфер, равного примерно 0,7, то есть капли масла несколько деформируются. Объемная доля дисперсной фазы существенно влияет на вязкость эмульсии, которая с увеличением ϕ может меняться от маловязкой жидкости до пасты.
- *Состав и толщина поверхностного слоя вокруг капель.* Они определяют межфазные свойства и силы коллоидного взаимодействия (см. раздел 13.2.7), причем последние существенно влияют на физическую стабильность.

Состав дисперсионной среды. От него зависят условия растворения ПАВ, значения pH и ионной силы, и тем самым коллоидные взаимодействия. Вязкость дисперсионной среды оказывает явное воздействие на отстаивание.

В отличие от твердых частиц в суспензии капли эмульсии имеют сферическую форму (значительно упрощающую многие прогнозные расчеты) и деформируются (что облегчает разрушение и коалесценцию капель). Кроме того, их межфазная поверхность является жидкой, и на ней могут возникать градиенты межфазного натяжения. Тем не менее, в большинстве ситуаций капли эмульсии ведут себя как твердые

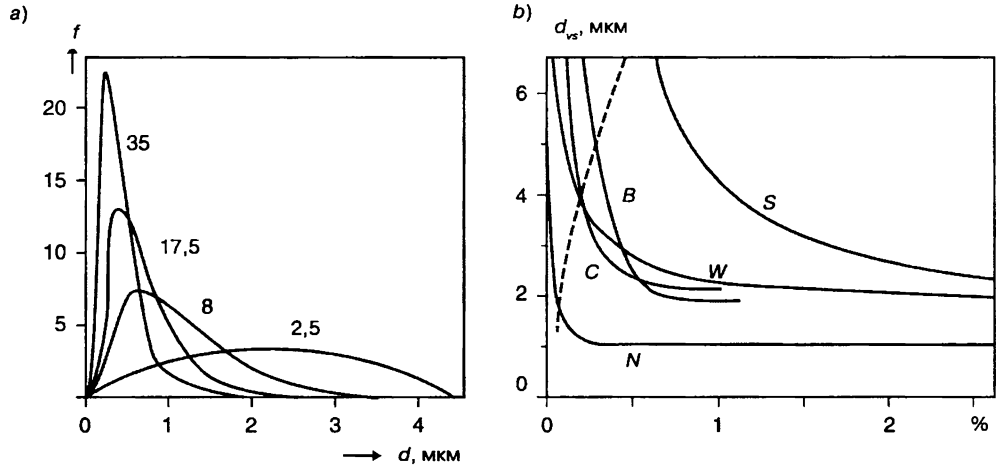


Рис. 13.25. Влияние различных условий эмульгирования на конечный размер капель: *a* — влияние давления гомогенизации (указано рядом с кривыми, МПа) на частотное распределение (%) объема масла при ширине интервалов группировки диаметра капель *d*, равном 0,1 мкм, на примере внесения 3,5% растительного масла в обезжиренное молоко; *b* — влияние концентрации эмульгатора (%масс.) на средний диаметр капель d_{vs} для различных эмульгаторов. Примерные результаты для 20% масла и эмульгирования средней интенсивности. По *Walstra, P. Physical Chemistry of Foods.* — NY: Marcel Dekker, 2003. *B* — белок крови; *C* — казеинат натрия; *N* — неионное низкомолекулярное поверхностно-активное вещество; *S* — соевый белок; *W* — сывороточный белок.

частицы. Из уравнения (13.8) следует, что у капли с радиусом 1 мкм и межфазным натяжением $\gamma = 5$ мН/м давление Лапласа будет равно 104 Па. Для вязкости жидкости (воды) $\eta = 10^{-3}$ Па·с и градиента скорости ∇v 10^5 $с^{-1}$, достигаемого при перемешивании или течении (очень сильном), напряжение сдвига $\eta\nabla v$, действующего на каплю, будет равно 10^2 Па. Это означает, что деформация капли будет незначительной. Кроме того, наличие ПАВ на поверхности капли позволяет этой поверхности выдерживать напряжение сдвига (см. раздел 13.2.6). Для указанных условий разница межфазного натяжения на двух сторонах капли (величиной 1 мН/м) будет более чем достаточной для предотвращения поперечного перемещения поверхности раздела, и такая величина достигается довольно легко. Можно заключить, что если перемешивание не слишком сильное или размер капель не очень велик, то капли эмульсии ведут себя как твердые сферы.

13.6.2. Образование эмульсии

В этом разделе по материалам работ [80, 90, 91] мы рассмотрим размер капель эмульсии и поверхностную нагрузку в ходе приготовления эмульсий (главным образом, при использовании белка в качестве ПАВ).

Дробление (диспергирование) капель. Для образования эмульсии требуется жидкая жировая фаза, вода, эмульгатор (то есть подходящее поверхностно-активное вещество) и энергия (как правило, механическая). Сформировать капли не трудно, но разделить их на более мелкие намного труднее. Лапласово давление капель, возрастающее с уменьшением размера капель, противодействует их деформации и тем самым дроблению. Для этого необходимо много энергии, но ее количество можно уменьшить, понизив межфазное натяжение (и, следовательно, давление Лапласа) путем добавления эмульгатора, хотя это и не основная его роль.

Энергию, необходимую для деформирования и дробления капель, обычно обеспечивает интенсивное перемешивание, с помощью которого можно обеспечить достаточно большие усилия сдвига (если дисперсионная среда достаточно вязкая). Это ситуация типична при приготовлении эмульсий типа «вода-в-масле» ($\eta_{масла} \approx 0{,}05$ Па·с) с конечным диаметром капель в несколько мкм. В эмульсиях типа «масло-в-воде» вязкость дисперсионной среды обычно невелика, и для дробления капель необходимы силы инерции, создаваемые быстрыми, интенсивными колебаниями давления в турбулентном потоке. Наиболее предпочтительным устройством для этого является гомогенизатор высокого давления, позволяющий формировать капли размером около 0,1 мкм. Средний размер капель примерно пропорционален давлению гомогенизации в степени –0,6 (см. рис. 13.25, *a*). При использовании высокоскоростных смесителей пере-

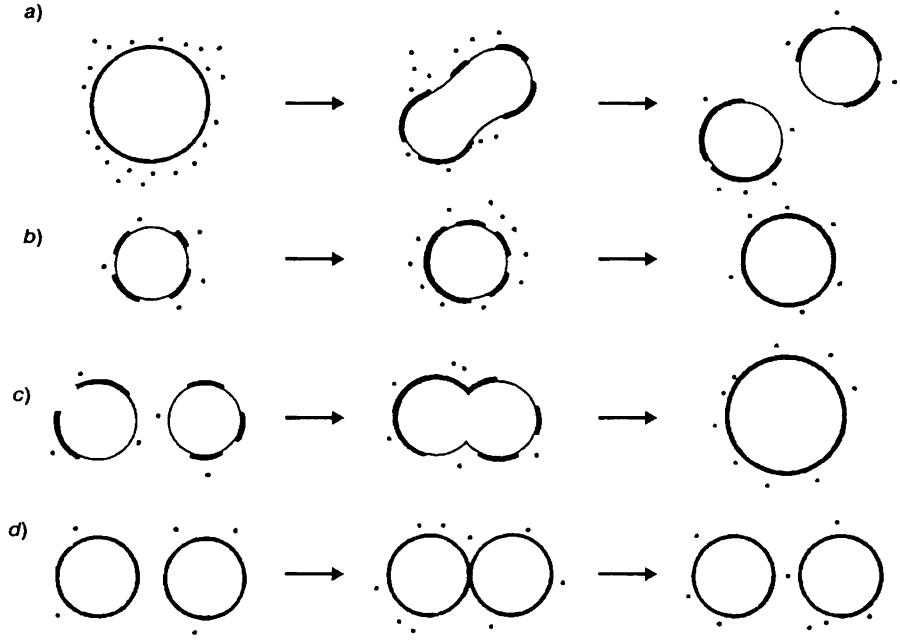


Рис. 13.26. Схематическое представление наиболее важных процессов, происходящих при эмульгировании. Тонкими линиями обозначены собственно капли, а жирными линиями и точками — эмульгаторы. По Walstra P. *Physical Chemistry of Foods*. — NY: Marcel Dekker, 2003

мешивание происходит быстрее, причем при длительном перемешивании или перемешивании в меньшем объеме образуются более мелкие капли, хотя средний диаметр капель менее 1–2 мкм обычно не достижим.

На размер капель влияют и другие факторы. Различные процессы, происходящие при эмульгировании, показаны на рис. 13.26. Помимо дробления капель (рис. 13.26, *a*) к недавно образовавшейся поверхности раздела необходимо доставить эмульгатор (рис. 13.26, *b*). Перенос эмульгатора обеспечивается конвекцией, а не диффузией и происходит очень быстро. Высокая турбулентность (или высокая скорость сдвига) приводит к частым столкновениям капель (рис. 13.26, *c* и *d*). Если капли еще недостаточно покрыты ПАВ, они могут повторно коалесцировать (рис. 13.26, *c*). Все эти процессы происходят в своем масштабе времени (как правило, несколько мкс), зависящем от нескольких условий. Это означает многократное повторение всех процессов даже в ходе одного прохода через клапан гомогенизатора и достижение более или менее устойчивого состояния, при котором процесссы дробления и коалесценции капель уравновешиваются.

Основная роль эмульгатора — это предотвращение повторной коалесценции (рекоалесценции) образующихся капель. Вполне логично было бы приписать эту функцию силам коллоидного отталкивания между каплями, обусловленным адсорбированным ПАВ, однако вследствие перемешивания в турбулентном или ламинарном потоке капли многократно «спрессовываются». Максимальное значение напряжения при этом одного порядка с напряжением, необходимым для дробления капель, величина которого одного порядка с их давлением Лапласа (например, 10^4 Па). Расчеты показывают, что давление «разъединения» капель вследствие коллоидного отталкивания, как правило, будет существенно меньше (например, 10^2 Па и ниже), то есть оно недостаточно для предотвращения тесного сближения капель и поэтому не будет предотвращать их рекоалесценцию. Экспериментальные данные зачастую свидетельствуют о слабой корреляции между рекоалесценцией при эмульгировании и коалесценцией в готовой эмульсии.

Возможен следующий механизм предотвращения перекоалесценции. Когда две капли, (частично) покрытые ПАВ, тесно сжимаются, то находящаяся между ними жидкость «выдавливается», вызывая образование градиента межфазного натяжения (рис. 13.27). В свою очередь этот γ-градиент значительно замедляет течение жидкости (см. пояснения к рис. 13.9, *a* и *d*), существенно уменьшающее скорость сближения капель. Это хотя и не предотвратит их очень тесное сближение, но напряжение при сближении, как пра-

вило, будет кратковременным или даже изменит знак (то есть капли будут отталкиваться) прежде, чем капли смогут коалесцировать. Выборочные расчеты подтверждают, что напряжения и масштабы времени при этом имеют соответствующий порядок величин.

Это явление зачастую называют эффектом Гиббса–Марангони. Его величина зависит от модуля упругости Гиббса для пленки (то есть удвоенного локального поверхностного дилатационного модуля), а механизм обусловлен эффектом Марангони.

Правило Бэнкрофта гласит, что при образовании эмульсии из жира (масла), воды и ПАВ (эмульгатора) дисперсионная среда становится такой, в которой ПАВ лучше всего растворяется. На рис. 13.27 в дисперсионной среде присутствует поверхностно-активное вещество. Если оно находится в каплях, то γ-градиент вряд ли может образоваться, поскольку молекулы ПАВ легко достигают поверхности раздела, что приводит к образованию адсорбционного слоя почти с постоянным составом. Если же ПАВ находится в дисперсионной среде, то тонкая пленка между сближающимися каплями вскоре почти полностью лишится ПАВ, и γ-градиент сохраняется. Следовательно, если требуется образование эмульсии типа «вода-в-масле», то необходимо использовать ПАВ с небольшим значением ГЛБ, тогда как для эмульсии типа «масло-в-воде» необходимо ПАВ с высоким значением ГЛБ.

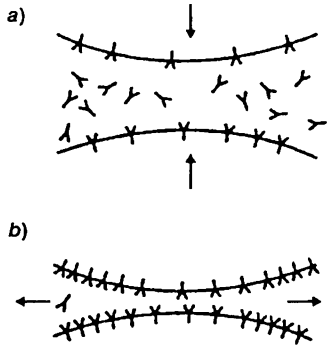


Рис. 13.27. Сближение двух капель при эмульгировании. Показано образование γ-градиента, замедляющего отток дисперсионной среды из промежутка между каплями. Y — молекулы ПАВ. По Walstra P. *Chem. Eng. Sci.*, 1993, 48, p. 333–349.

Наиболее предпочтительными эмульгаторами для пищевых эмульсий типа «масло-в-воде» являются белки, поскольку они съедобны, поверхностно активны, растворимы в воде и обеспечивают высокую стойкость к коалесценции [86]. Тем не менее, при одинаковой интенсивности перемешивания капли получаются существенно большего размера, чем при использовании в той же массовой концентрации соответствующего низкомолекулярного ПАВ. Основная причина этого видна из рис. 13.3, *b*: чтобы получить значительное снижение γ для белка, необходима значительно большая поверхностная нагрузка (*Γ*) на поверхности раздела «масло–вода», чем для *SDS*. Это означает, что вероятность создания при эмульгировании с помощью белка значительного γ-градиента намного меньше, чем при использовании *SDS* и большинства других низкокомолекулярных эмульгаторов. Следовательно, степень рекоалесценции капель будет намного больше, чем у *SDS*, что и наблюдается экспериментально.

Размер капель можно уменьшить путем более интенсивного эмульгирования, например, при более высоком давлении гомогенизации (при условии присутствия достаточного количества белка). Некоторые примеры капель среднего размера (d_{vs}) приведены на рис. 13.25, *b*. При высокой концентрации эмульгатора значение d_{vs} достигает уровня плато. Это значение для неионогенных ПАВ меньше, чем для белков (в основном потому, что они создают более низкое межфазное натяжение).

Из рис. 13.25, *b* следует, что у различных белков примерно одинаковое значение плато для d_{vs}. Это и понятно, поскольку они создают сравнимые значения межфазного натяжения (около 10 мН/м), однако при низких концентрациях очевидны большие различия в d_{vs}. Для оценки пригодности белков для использования в качестве эмульгаторов разработано несколько тестов. Широко известный индекс эмульгирующей активности (*EAI, emulsifying activity index*) основан на эмульгировании большого количества масла в разбавленном белковом растворе [55] и приблизительно соответствует условиям, обозначенным на рис. 13.25, *b* пунктирной линией. Результаты этого теста для большинства практических ситуаций не реалистичны, поскольку отношение «белок/жир» обычно будет намного больше, и, следовательно, значения *EAI* зачастую оказываются неадекватными.

Различия в значениях *EAI* у различных белков пытались объяснить различиями в гидрофобности их поверхности [33], однако корреляция оказалась плохой, и другими учеными была доказана несостоятельность этой концепции (см., например, работу [59]). Разная эмульгирующая способность белков обусловлена, в основном, разницей их молярной массы или растворимости. При большей молярной массе и равной массовой концентрации молярная концентрация меньше, что предположительно является наиболее важным фактором сильного проявления эффекта Гиббса–Марангони. Поэтому белки с меньшей молярной массой являются более эффективными эмульгаторами. Следует иметь в виду, что некоторые

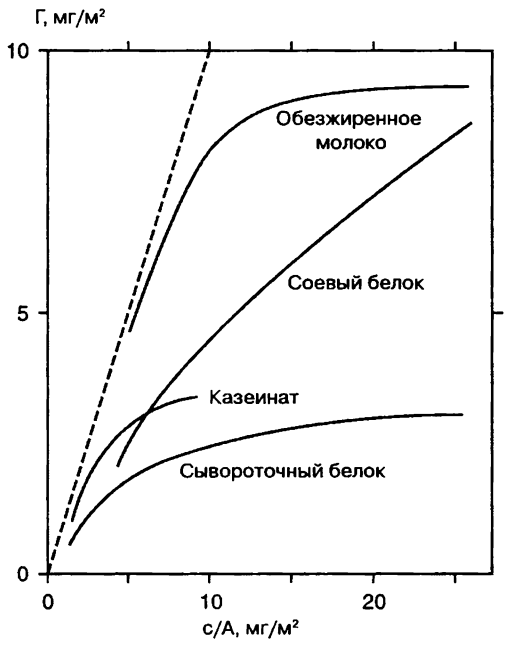


Рис. 13.28. Поверхностная нагрузка белка (Г) при эмульгировании как функция его концентрации (*c*) на единицу площади поверхности (*A*) масляной фазы. Пунктирной линией показана зависимость при условии адсорбции всего присутствующего белка. По [87]

белковые препараты, особенно промышленного производства, содержат молекулярные агрегаты различных размеров, которые значительно увеличивают эффективную молярную массу и снижают эмульгирующую способность. Как правило, плохо растворимые белковые препараты являются плохими эмульгаторами.

Существенно меньшая молярная масса, получаемая, например, в результате частичного гидролиза белка, приводит к образованию более мелких капель. С другой стороны, эмульсии, полученные с использованием относительно мелких пептидов, обычно характеризуются значительной коалесценцией [61].

Еще одной важной переменной является поверхностная нагрузка (*Г*). Если эмульгатор обеспечивает большую поверхностную нагрузку, то для создания эмульсии требуется относительно большое количество эмульгатора (ср., например, сывороточный и соевый белки, рис. 13.25, *b* и 13.28). Кроме того, для получения стабильной эмульсии необходимо довольно большое значение Г. В случае низкомолекулярных ПАВ достигается равновесие между Г и объемной концентрацией ПАВ. Следовательно, вычислить Г независимо от способа образования эмульсии можно, зная общую концентрацию ПАВ, площадь поверхности раздела «масло–вода» и изотермы адсорбции (приведенные, например, на рис. 13.3, *a*). При использовании в качестве эмульгатора белка (или другого полимера) дело обстоит иначе, поскольку в этом случае термодинамическое равновесие не достигается (см. раздел 13.2.2). Таким образом, кроме упомянутых переменных поверхностная нагрузка белка может зависеть от способа приготовления эмульсии.

Опыт показывает, что для увязывания Г с концентрацией белка наиболее удобны графики, подобные приведенным на рис. 13.28. На этом рисунке представлены некоторые результаты, полученные для разных белков. Если отношение *c/A* очень мало, то некоторые белки на поверхности раздела «масло–вода» могут почти полностью «разворачиваться», образуя растянутый полипептидный слой со значением Г около 1 мг/м². Некоторые хорошо растворимые белки имеют значения плато около 3 мг/м², а значения для агрегированных белков могут быть намного больше. Можно также отметить, что любые присутствующие крупные белковые агрегаты в ходе эмульгирования преимущественно адсорбируются, тем самым еще больше увеличивая Г.

Эмульгатор необходим не только для образования эмульсии, но и для обеспечения стабильности готовой эмульсии. Эти основные, зачастую не связанные между собой функции следует четко различать. Эмульгатор может быть хорошим для получения мелких капель, но при этом не обеспечивать долговременной стойкости к коалесценции, и наоборот, в связи с чем оценка белков только по их способности к образованию мелких капель не очень полезна. Еще одной желаемой характеристикой ПАВ является предотвращение агрегации в некотором диапазоне условий (значение pH вблизи изоэлектрической точки, высокая ионная сила, низкое качество растворителя, высокая температура). Типы нестабильности эмульсий и способы предотвращения этой нестабильности мы рассмотрим далее.

13.6.3. Типы нестабильности эмульсий

Эмульсии могут подвергаться физическим изменениям нескольких типов (рис. 13.29). На этом рисунке показаны изменения, касающиеся эмульсии типа «масло-в-воде». Различие с эмульсией типа «вода-в-масле» состоит в том, что вместо верхней седиментации (отстаивание или сливкообразование) происходит нижняя седиментация (осаждение).

Созревание Оствальда (рис. 13.29, *a*) в эмульсиях типа «масло-в-воде», как правило, не наблюдается, поскольку обычно используются нерастворимые в воде триацилглицериновые масла. В случае присутствия эфирных масел (например, в цитрусовых соках) некоторые из них достаточно растворимы для постепенного исчезновения наиболее мелких капель [23]. Созревание Оствальда происходит в эмульсиях типа «вода-в-масле». Данные, приведенные в табл. 13.3, свидетельствуют об очень небольшом «излишке» растворимости для капель размером 2 мкм, но его вполне достаточно для заметного созревания Оствальда в ходе длительного хранения. Его легко можно предотвратить путем внесения в водную фазу соответствующего (то есть, жиронерастворимого) вещества. Для этого вполне подходит соль (например, NaCl) в низкой концентрации: как только небольшая капелька сжимается, то концентрация соли в ней и осмотическое давление возрастают, и тем самым создается движущая сила для миграции влаги в противоположном направлении. В результате обеспечивается стабильное распределение размера капель [19, 51, 85, 86].

Другие виды нестабильности эмульсий рассмотрены в соответствующих разделах — об отстаивании см. раздел 13.4.2, об агрегации — 13.4.3, о коалесценции — 13.6.4, о частичной коалесценции — раздел 13.6.5.

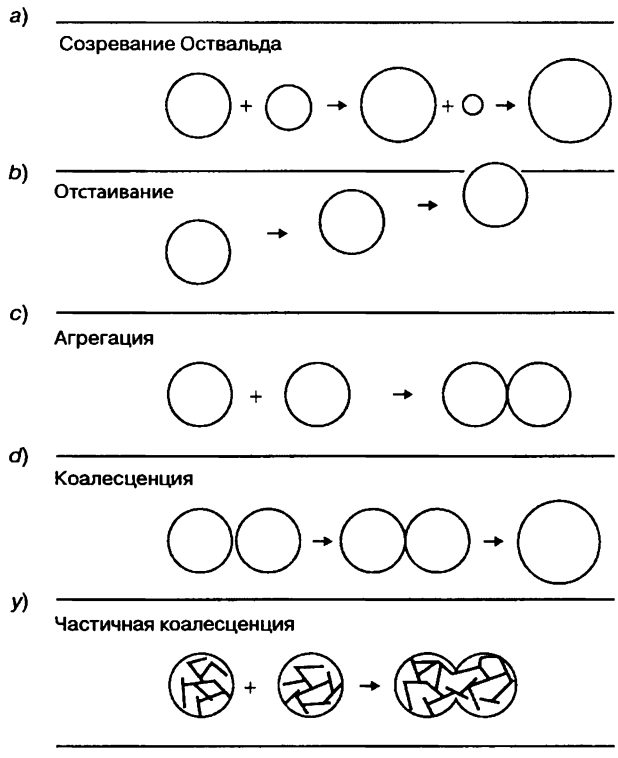


Рис. 13.29. Схематическое представление разных типов физической нестабильности эмульсий типа «масло-в-воде». Размер поверхности контакта в (*d*) сильно преувеличен; короткими жирными линиями в (*e*) обозначены кристаллы ТАГ

Различные типы изменений могут влиять друг на друга. Агрегация значительно увеличивает отстаивание, которое, в свою очередь, повышает скорость агрегации и т. д. Коалесценция может произойти только тогда, когда капли находятся близко друг к другу, то есть в агрегате или в отделившемся (отстоявшемся) слое. В более компактном отделившемся слое, состоящем из довольно крупных обособленных капель, коалесценция происходит быстрее. Если в отстоявшемся слое происходит частичная коалесценция, то этот слой может напоминать твердую пробку.

Зачастую бывает желательно выявить тип нестабильности данной эмульсии. Коалесценция приводит к образованию крупных капель, а не агрегатов неправильной формы или комков. При нагревании, достаточном для плавления кристаллов жира, эти комки в результате частичной коалесценции сливаются в крупные капли. Установить конкретный тип нестабильности (агрегацию, коалесценцию или частичную коалесценцию) можно с помощью светового микроскопа. Некоторые рекомендации по определению различных причин агрегации приведены в разделе 13.4.3. Коалесценция или частичная коалесценция зачастую приводит к широкому распределению размера капель с последующей быстрой верхней седиментацией более крупных капель или комков.

Нарушить отстаивание и разрушить агрегаты слабо удерживаемых капель (но не комков, образовавшихся в результате частичной коалесценции) может перемешивание. Истинной коалесценции, как правило, препятствует медленное перемешивание.

Введение воздуха в эмульсию типа «масло-в-воде» может привести к адсорбции капель на пузырьках воздуха. Эти капли затем могут разделиться на более мелкие вследствие растекания масла по поверхности раздела «воздух-вода» (см. раздел 13.2.3). Если капли содержат кристаллический жир, то может произойти комкование, то есть введение воздуха поддерживает частичную коалесценцию, и именно это происходит во время сбивания сливочного масла, а также при взбивании сливок. В последнем случае агрегированные,

частично твердые капли образуют непрерывную сеть, которая инкапсулирует и стабилизирует пузырьки воздуха, придавая пене жесткость.

Одним из способов предотвращения или замедления всех изменений эмульсии (за исключением созревания Оствальда) является иммобилизация капель, в частности, путем образования дисперсионной средой геля (см. раздел 13.5.2). Примерами могут служить сливочное масло и маргарин, в которых капли воды иммобилизованы сетью кристаллов жира. Более того, некоторые кристаллы на поверхности раздела «масло-вода» становятся ориентированными благодаря благоприятному краевому углу (см. раздел 13.2.3). Тем самым капли не могут тесно сблизиться друг с другом. Если при нагревании продукта кристаллы плавятся, то капли воды легко коалесцируют. Для предотвращения быстрой коалесценции при нагревании, приводящей к нежелательному разбрызгиванию, в маргарин обычно добавляют соответствующее ПАВ.

13.6.4. Коалесценция

Здесь мы рассмотрим, в основном, эмульсии типа «масло-в-воде», но следует учитывать, что многие теоретические моменты до сих пор до конца не ясны [25, 85, 86].

Разрыв пленки. Коалесценция вызывается разрывом тонкой пленки (ламеллы) между близкими каплями или пленки между пузырьками газа (рис. 13.30, *a*): небольшое отверстие может образоваться в пленке случайно из-за броуновского движения. Если радиус такого отверстия больше половины толщины пленки ($R > \Delta/2$), то давление Лапласа вблизи зоны *1* больше, чем вблизи зоны *2*, и, следовательно, жидкость в пленке будет течь от зоны *1* к зоне *2*, отверстие будет расширяться, а пленка разрываться, и возникнет общее течение капель. Из этого также следует, что любая пленка, если она станет достаточно тонкой, будет разрываться, а противодействуют этому силы коллоидного отталкивания. На рис. 13.30, *b* показано, что из-за образования симметричных волн на поверхностях пленки она может стать локально тоньше. Амплитуда волн может быть довольно большой, и разрыв пленки более вероятен при большей длине волны (то есть при большей площади пленки) и меньшем значении γ.



Рис. 13.30. Поперечное сечение части пленки между каплями (или пузырьками газа) со средней толщиной Δ: *a* — образование дырки; *b* — свойства симметричной волны

Теоретические аспекты мы здесь рассматривать не будем, в том числе и потому, что теория не объясняет полученные результаты наблюдений коалесценции капель. Известно, например, что некоторые высокомолекулярные ПАВ придают эмульсии дополнительную стойкость к коалесценции. Предполагают, что молекулы ПАВ образуют когерентные мономолекулярные слои, которые для разрыва пленки также должны разрываться. Типичными примерами являются белки (в частности, β-лактоглобулин), которые после адсорбции обычно образуют когерентные слои (в этом, по-видимому, участвуют межмолекулярные связи —S—S—).

Таким образом, разрыв пленки — это случайное событие с важными последствиями:

- вероятность коалесценции, если она действительно происходит, пропорциональна времени, в течение которого капли находятся близко друг к другу, то есть она особенно вероятна в отстоявшемся слое или в агрегатах;
- коалесценция — это кинетический процесс первого порядка относительно времени (в отличие от агрегации, которая, в принципе, относится к процессам второго порядка);
- вероятность разрыва пленки пропорциональна ее площади, то есть коалесценции способствует сплющивание сближающихся капель и тем самым увеличение площади пленки.

Именно поэтому образование плоской пленки является важной переменной, которая может быть выражена числом Вебера, отражающим отношение локального напряжения на паре капель к лапласову давлению капли. Локальное напряжение — это внешнее напряжение (σ_{ca}), умноженное на коэффициент

концентрации напряжений. Последний равен отношению радиуса капель к наименьшему расстоянию (h) между поверхностями капель. Это приводит к следующему выражению:

$$We = \frac{\sigma_{ex} d^2}{8\gamma h}. \tag{13.30}$$

Если $We > 1$, то между каплями образуется плоская пленка (чем больше We, тем больше радиус пленки). Если $We << 1$, то пленка просто не образуется и коалесценции фактически не происходит.

Внешнее напряжение может быть обусловлено коллоидными силами притяжения или гидродинамическими напряжениями, вызванными течением, перемешиванием, гравитационным или центробежным напряжением в отделившемся слое (или осадке). Для небольших капель эмульсии, покрытых белком, условие $We << 1$ почти всегда выполняется (если не действуют сильные внешние силы). Даже в отделившемся слое, образующемся под действием силы тяжести, внешнее напряжение достаточно мало, чтобы значение We было значительно меньше единицы.

С учетом вышеизложенного можно сделать вывод, что коалесценция менее вероятна в следующих случаях.

- *Более мелкие капли.* Меньший размер капель дает меньшее значение We и, следовательно, меньшую площадь пленки между каплями с меньшей вероятностью разрыва пленки; для получения капель определенного размера требуется больше коалесцентных событий; скорость верхней седиментации (отстаивания) снижается (на практике средний размер капель зачастую является очень важной переменной).

  Более утолщенная пленка между каплями. В этом случае стойкость к коалесценции обеспечена сильными или дальнедействующими силами отталкивания между каплями (см. раздел 13.3). В случае взаимодействий ДЛФО-типа коалесценция происходит легко, если капли агрегируются в основном минимуме (см. рис. 13.11). Обычно особенно эффективно противодействует коалесценции стерическое отталкивание, поскольку оно удерживает капли на относительно большом расстоянии друг от друга.

  Большее межфазное натяжение. Это может показаться странным, поскольку для образования эмульсии необходимо ПАВ, которое уменьшает значение γ. Кроме того, меньшее значение γ предполагает меньшую поверхностную свободную энергию системы и, следовательно, меньшую движущую силу для коалесценции. Тем не менее здесь важна именно свободная энергия активации, необходимая для разрыва пленки, которая тем больше, чем больше значение γ. Дело в том, что для разрыва пленки необходима локальная деформация, а большее значение γ затрудняет вздутие или образование на пленке волны.

С учетом всего пересчисленного для предотвращения коалесценции очень подходят белки, что согласуется с данными наблюдений. Белки не создают очень малое значение γ и зачастую обеспечивают значительные силы отталкивания (как электрического, так и стерического). Результаты экспериментов, в которых небольшим каплям в очень разбавленном белковом растворе была предоставлена возможность адсорбироваться на плоских поверхностях раздела «масло—вода» и регистрировалось время, необходимое для коалесценции, приведены на рис. 13.31. Сильное влияние размера капель очевидно. Эти результаты были получены в таких условиях (концентрация белков и время адсорбции), при которых поверхностная нагрузка белков не превышала 0,5 мг/м^2, что предполагает очень слабые силы отталкивания. В тех случаях, когда допускалось образование более толстого адсорбированного слоя, коалесценция практически не наблюдалась.

Из этого рисунка следует, что по способности белков предотвращать коалесценцию большой разницы между белками не существует. Это подтверждается также практическим опытом (за исключением желатина, который несколько менее эффективен, чем большинство других белков). В более сложных условиях (см. ниже) между белками могут наблюдаться различия, причем наиболее эффективными обычно оказываются казеинаты. Частичный гидролиз белков значительно ослабляет их способность предотвращать коалесценцию [61].

Предпринимались попытки связать способность белков (и других ПАВ) к ингибированию коалесценции с различными их свойствами, в частности, с поверхностной сдвиговой вязкостью (см. раздел 13.2.5) адсорбированного белкового слоя. В одних случаях, действительно, наблюдается положительная корреляция между (кажущейся) поверхностной сдвиговой вязкостью и стойкостью к коалесценции, но в других

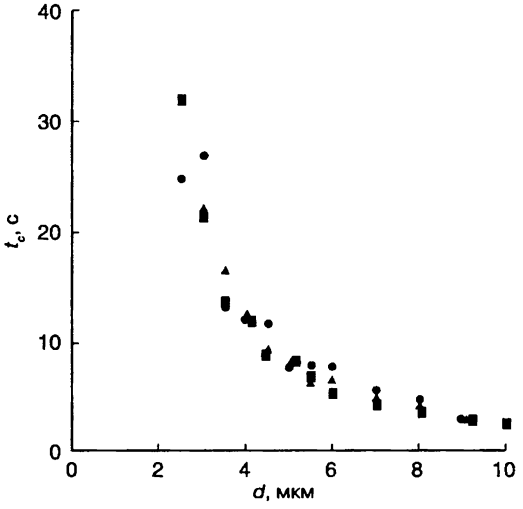


Рис. 13.31. Среднее время коалесценции (t_c) капель масла различного диаметра (d) в случае плоской поверхности раздела «масло–вода» в белковых растворах 20-минутной выдержки при концентрации белка 1 мг/кг. ▲ — бета-казеин; ● — каппа-казеин; ■ — лизоцим. По [25]

отклонение от этой зависимости оказывается довольно большим: например, казеинаты дают очень низкую поверхностную сдвиговую вязкость, но при этом весьма хорошую стойкость к коалесценции. Приемлемые корреляции наблюдаются для многих глобулярных белков в тех случаях, когда капли относительно велики или значение Г достаточно мало. Основанием для увеличения стойкости, предположительно, является вышеупомянутое образование межмолекулярных поперечных сшивок на поверхности раздела.

С другой стороны, в сильно концентрированной эмульсии (например, при $\phi = 0{,}8$), подвергаемой при выдавливании через небольшое отверстие сильному продольному течению (то есть течению с продольным градиентом скорости), может происходить значительная коалесценция, если поверхностные слои состоят из поперечно сшитых глобулярных белков [70]. Объяснение этого факта основывается на рассмотрении эмульсии как «полутвердого» (упругопластичного) тела, подвергаемого макроскопическому разрушению (разлому, см. раздел 13.5.1). По-видимому, плоскости такого разлома проходят через капли эмульсии, вызывая сильную локальную коалесценцию. В эмульсиях с высокими значениями ϕ, стабилизированных казеинатом, который не образует прочных межмолекулярных поперечных сшивок, значительной коалесценции при продольном течении не отмечается.

Большинство низкомолекулярных ПАВ создают небольшое межфазное натяжение. Поскольку коалесценции способствует небольшое значение γ, одними из наиболее эффективных являются ПАВ, обеспечивающие значительное стерическое отталкивание (например, Твины). Ионногенные ПАВ эффективны в отношении коалесценции только при низкой ионной силе.

Низкомолекулярные ПАВ, присутствующие (или добавленные) в стабилизированных белком эмульсиях, склонны вытеснять белок с поверхности капли (см раздел 13.2.2 и рис. 13.5), тем самым снижая стойкость к коалесценции. Это свойство может использоваться для обеспечения желаемой коалесценции — например, быстрая коалесценция в большинстве случаев может быть обеспечена добавлением *SDS* и некоторых солей (для уменьшения толщины двойного слоя).

Коалесценция может также наблюдаться у пищевых эмульсий при экстремальных условиях. Например, образование кристаллов льда при замораживании вызывает сближение капель эмульсии, что зачастую приводит к сильной коалесценции при размораживании. Нечто подобное происходит после сушки и последующего повторного диспергирования — в этом случае коалесценция облегчается относительно высокой концентрацией «нежировых сухих веществ». В таких случаях повышение стойкости к коалесценции обеспечивается наличием мелких капель и толстого белкового слоя (например, казеината натрия).

Еще одним экстремальным условием является центрифугирование, которое обеспечивает быстрое образование отделившегося слоя и «спресовывание» капель с достаточной силой для получения высокого значения *We*, то есть вызывает значительное сплющивание даже мелких капель и, вероятно, коалесценцию. Это означает, что тестирование на центрифуге в целях прогнозирования стойкости эмульсий к коалесценции при хранении обычно не правомерно, так как условия в ходе центрифугирования и при хранении сильно отличаются. Это не означает, что испытания центрифугированием для прогнозирования отстаивания бесполезны — наоборот, они весьма полезны, если учитываются сложности, рассмотренные в разделе 13.4.2.

Прогнозирование скорости коалесценции всегда сопряжено с большими трудностями. Наилучшим подходом представляется использование некоторого чувствительного метода оценки среднего размера капель (например, мутности при соответствующей длине волны) и оценка его изменения (например, через несколько суток).

13.6.5. Частичная коалесценция

Во многих пищевых эмульсиях типа «масло-в-воде» часть масла в каплях может кристаллизоваться. Доля твердого жира (Ψ) зависит от состава смеси триацилглицеринов и температуры (см. главу 4). В каплях эмульсии значение Ψ может также зависеть от температурной предыстории, поскольку тонко эмульгированная масляная фаза может проявлять значительное и длительное переохлаждение, причем чем мельче капли, тем оно значительнее (рис. 13.32) [81]. Если капля эмульсии содержит кристаллы жира, то последние обычно образуют непрерывную сеть. Эти явления во многом обусловливают стабильность эмульсии. Присутствие кристаллов жира означает, что мы имеем дело не с истинной эмульсией «масло-в-воде», и в этом случае лучше говорить о жировых глобулах [6–8, 14, 42, 72, 85].

Жировые глобулы с сетью жировых кристаллов полностью коалесцировать не могут (см. рис. 13.27, *е*). При разрыве пленки между жировыми глобулами они образуют комок неправильной формы, скрепленный «шейкой» из жидкой масляной фазы, из-за чего истинная и частичная коалесценции имеют разные последствия. Частичная коалесценция вызывает увеличение объемной доли диспергированной фазы, и если ее первоначальная объемная доля составляет 0,2 и более, а скорость сдвига достаточно мала, то может образоваться твердотельная или гелеподобная сеть из частично коалесцированных комков.

Разрыв пленки между жировыми глобулами может вызываться кристаллом, выступающим из поверхности глобулы и прокалывающим пленку. Особенно часто это происходит в ходе течения или перемешивания, после чего частичная коалесценция может произойти, например, на шесть порядков быстрее, чем истинная коалесценция в такой же эмульсии, но без кристаллов жира. Это означает, что если эмульсия типа «масло-в-воде» подвержена кристаллизации жира, то частичная коалесценция становится намного важнее истинной.

Кинетика частичной коалесценции из-за влияния различных факторов сложна и изменчива. Во многих эмульсиях крупные частицы (первоначальные жировые глобулы или уже образованные комки) более предрасположены к частичной коалесценции, чем мелкие, что приводит к самоускоряющемуся процессу с образованием крупных комков, которые быстро отстаиваются. При этом средний размер частиц в неотстоявшемся слое затем может уменьшаться. В других же эмульсиях со временем может просто происходить постепенное увеличение среднего размера частиц.

Наиболее важными факторами, влияющими на скорость частичной коалесценции, обычно являются следующие (см. рис. 13.33).

- *Скорость сдвига* имеет различные последствия: 1) скорость столкновения частиц пропорциональна скорости сдвига (см. раздел 13.4.3); 2) сдвиговое течение будет поворачивать две сталкивающиеся жировые глобулы относительно друг друга, тем самым значительно увеличивая вероятность того, что кристалл, выступающий из одной глобулы, быстро окажется в непосредственной близости к другой глобуле; 3) усилие сдвига будет плотнее сжимать сближающиеся глобулы несмотря на силы отталкивания между ними, увеличивая тем самым вероятность прокалывания пленки выступающим кри-

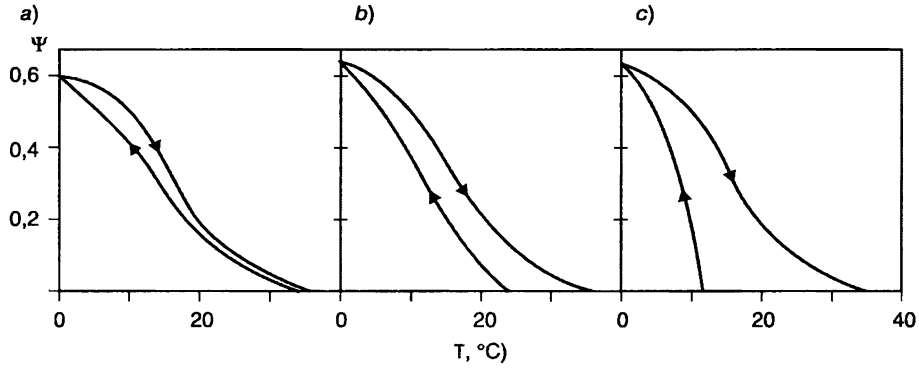


Рис. 13.32. Доля твердого молочного жира (Ψ) через 24 ч холодильного хранения при температуре *T* и последующем нагревании (после выдержки при 0 °С): *а* — общая массовая доля жира; *b* — тот же жир в натуральных сливках (размер жировых глобул около 4 мкм); *с* — тот же жир в гомогенизированных сливках (размер жировых глобул около 0,5 мкм). По Walstra P., van Beresteyn E. C. H. *Neth. Milk. Dairy J.*, 1975, 29, p. 35.

сталлом. Таким образом, скорость потока оказывает очень большое влияние на скорость частичной коалесценции, причем это влияние оказывается еще сильнее, если течение не ламинарное, а турбулентное.

Объемная доля капель. Для больших значений ϕ скорость частичной коалесценции, очевидно, больше (степенная зависимость от ϕ почти второго порядка).

Кристаллизация жира. Если доля твердого жира Ψ равна нулю, то частичная коалесценция невозможна; она не происходит также в отсутствие жидкой жировой фазы ($\Psi = 1$). Для довольно низких значений Ψ скорость частичной коалесценции, как правило, с увеличением Ψ возрастает, поскольку с ростом Ψ из жировых глобул выступает больше кристаллов. Тем не менее, зависимость между Ψ и скоростью не постоянна (в значительной степени из-за вариации размера и расположения кристаллов). Здесь важно то, что кристаллы должны образовать своеобразную сетку во всей жировой глобуле, обеспечивающую «поддержку» выступающим кристаллам. Минимальное значение Ψ для образования такой сетки обычно близко к 0,1. Если кристаллизуется большая часть жировой фазы и кристаллы очень мелкие, то кристаллическая сетка способна прочно удерживать остальную жидкую жировую фазу, тем самым предотвращая частичную коалесценцию даже в случае прокола пленки. Более того, величина выступа может зависеть от значения Ψ, температурной предыстории, размера и формы кристаллов.

Диаметр глобул. Обычно наблюдается зависимость, приведенная на рис. 13.33, *d*, но распределение размеров жировых глобул у разных эмульсий существенно варьирует. Влияние *d* предположительно обусловлено, во-первых, воздействием на крупные глобулы большего усилия сдвига и, во-вторых, большей площадью пленки между двумя крупными глобулами.

Тип ПАВ и его концентрация. Эти переменные, во-первых, определяют краевой угол в системе «масло–кристалл–вода» (см. раздел 13.2.3) и, следовательно, они влияют на величину выступа данного кристалла. Во-вторых, эти переменные определяют отталкивание (силу и диапазон действия) между глобулами. Чем слабее отталкивание, тем легче двум каплям эмульсии приблизиться друг к другу и тем больше вероятность, что выступающий кристалл проткнет пленку между ними. Таким образом, отталкивание, наряду с размером глобул, определяет минимальную скорость сдвига, необходимую для осуществления частичной коалесценции (наблюдались значения от 5 до 120 $с^{-1}$). В некоторых эмульсиях частичная коалесценция при исследованных скоростях сдвига вообще не наблюдалась. Наилучшим типом ПАВ для предотвращения частичной коалесценции является белок (если поверхностная нагрузка достаточно высока, рис. 13.33, *е*). Добавление низкомолекулярного ПАВ обычно приводит к вытеснению белка с поверхности (см. раздел 13.2.2) и к значительному увеличению частичной коалесценции (см. рис. 13.33, *f*).

Проиллюстрируем некоторые последствия частичной коалесценции на примере изготовления и свойств *мороженого* [51, 89].

Мороженое характеризуется сложной структурой и содержит кристаллы льда, жидкую фазу, состоящую из концентрированного обезжиренного молока с добавленными подслащивающими веществами, пузырьков воздуха и частично кристаллизованных глобул молочного жира. Пузырьки воздуха и кристаллы льда образуются в скребковом теплообменнике в ходе энергичного перемешивания и быстрого охлаждения. Жировые глобулы необходимы для покрытия воздушных пузырьков, обеспечивающего стойкость к созреванию Оствальда и коалесценции пузырьков (см. раздел 13.7.2).

В теплообменнике жировые глобулы подвергаются желаемой интенсивной частичной коалесценции, что приводит к образованию пространственной структурной сетки из комков жировых глобул и покрытых ими пузырьков воздуха. Такая структура обеспечивает «стойкость к плавлению», то есть после плавления кристаллов льда в ротовой полости определенная твердость сохраняется. Кроме того, она придает изделию «сухой» внешний вид и песчанистую консистенцию (последняя значительно снижает липкость продукта). Эти свойства делают мороженое более привлекательным для потребителя и дают возможность использовать быстродействующие упаковочные автоматы.

При изготовлении мороженого из натуральных (негомогенизованных) сливок (плюс сахар и некоторые добавки) частичная коалесценция происходит очень быстро. Глобулы натурального молочного

жира довольно крупные (преимущественно размером 1,5–6 мкм) и имеют поверхностный слой, обеспечивающий весьма низкое межфазное натяжение (1–1,5 мН/м). Кроме того, энергичное перемешивание приводит к образованию слишком крупных комков из жировых глобул, которые не способны полностью покрыть пузырьки воздуха. Такое готовое мороженое характеризуется грубой структурой с крупными пузырьками воздуха и большими комками жира. Этого можно избежать путем гомогенизации сливок, обеспечивающей значительное уменьшение размера жировых глобул (например, до 0,4–1,2 мкм). Поверхностные слои этих глобул состоят, преимущественно, из белков плазмы молока, которые ингибируют частичную коалесценцию (см. рис. 13.33, *d* и *e*). Готовый продукт в этом случае характеризуется гомогенной структурой с мелкими пузырьками воздуха, но при этом имеет недостаточную стойкость к плавлению и сухость.

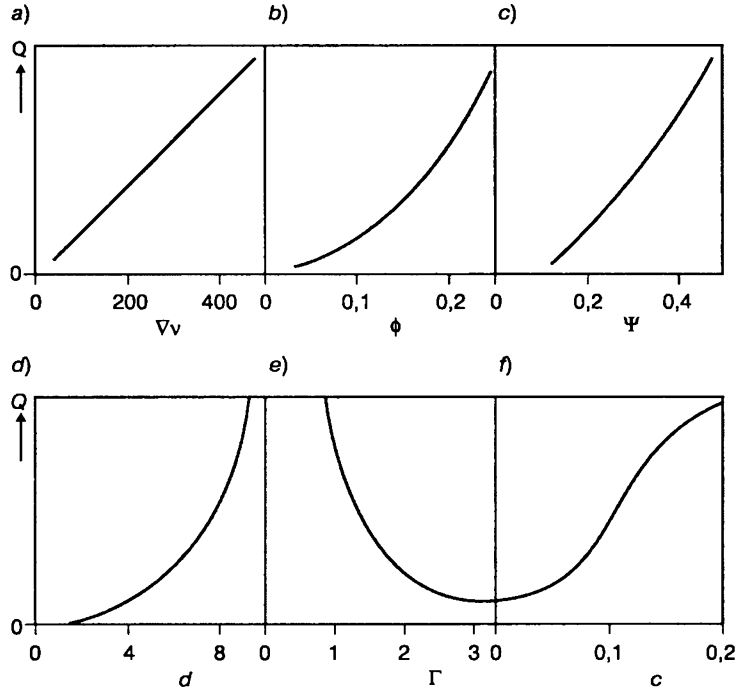


Рис. 13.33. Приближенные результаты по скорости частичной коалесценции (Q) в эмульсиях, стабилизированных белком, как функции: *a* — скорости сдвига ∇v ($с^{-1}$); *b* — объемной доли ϕ; *c* — доли твердого жира Ψ; *d* — среднего диаметра жировых шариков, *d*, мкм; *e* — поверхностной белковой нагрузки Г, мг/м²; *f* — концентрации добавленного низкомолекулярного ПАВ, *c*, %. Данные приведены только в иллюстративных целях для указания тенденций. По [80]

Последнюю проблему можно решить путем внесения низкомолекулярных ПАВ, которые существенно увеличивают скорость частичной коалесценции (рис. 13.33, *f*). Определить оптимальные условия для получения мороженого хорошего качества можно путем подбора типа и концентрации этих ПАВ.

13.7. Пены

В некотором смысле пены очень похожи на эмульсии типа «масло-в-воде» — и те и другие представляют собой дисперсии «гидрофобной» подвижной фазы в гидрофильной жидкости. Вместе с тем, их свойства качественно различаются, что обусловлено значительными количественными различиями (табл. 13.7). Очевидно, что столь большой диаметр пузырьков воздуха исключает пены из «царства коллоидов». Большой диаметр в сочетании с большой разницей плотности приводит к тому, что пенообразование происходит на несколько порядков быстрее, чем образование капель эмульсии. Относительно высокая растворимость воздуха в воде может вызвать быстрое созревание Оствальда (которое у пен, как правило, называют диспропорционированием). Если газовая фаза состоит из CO_2, как в некоторых пищевых продуктах (хлебобулочных изделиях и газированных напитках), то растворимость еще выше (почти в 50 раз). Для пен масштаб характеристического времени пенообразования на два или три порядка больше, чем для образования большинства эмульсий типа «масло-в-воде». Поскольку пенообразование и созревание Оствальда происходят очень быстро, физическая нестабильность обычно наблюдается еще в ходе процесса образования пены, что усложняет исследование пенообразования и стойкости пены.

Ниже мы вкратце рассматрим некоторые аспекты, касающиеся пен. Для пенообразования и свойств пен наиболее важны поверхностные явления, вводная информация о которых приведена в разделе 13.2. Дополнительными источниками информации могут служить работы [28, 56, 82, 90]. О взбивании и вспенивании сливок см. работы [51, 69]. Кроме того, главы по пенам есть в некоторых книгах, приведенных в разделе «Литература».

Таблица 13.7
Пены и эмульсии: порядок величин некоторых количественных характеристик

Характеристика	Пена 1	Пена 2	Эмульсия «вода-в-масле»	Эмульсия «масло-в-воде»
Диаметр капель (пузырьков), м	10^{-3}	10^{-4}	5×10^{-6}	10^{-6}
Объемная доля, безразмерная величина	0,9	0,8	0,1	0,1
Количество капель (пузырьков), $м^{-3}$	10^{9}	10^{11}	10^{15}	10^{17}
Межфазное натяжение, Н/м	0,05	0,05	0,005	0,01
Давление Лапласа, Па	$2 \cdot 10^{2}$	$2 \cdot 10^{3}$	$4 \cdot 10^{3}$	$4 \cdot 10^{4}$
Растворимость *D* в *C*, %об.	2,1[a]	2,1[a]	0,15	0
Разница плотности, *D*–*C*, $кг/м^3$	-10^{3}	-10^{3}	10^{2}	-10^{2}
Относительная вязкость *D*/*C*, безразмерная величина	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}	10^{2}
Масштаб времени [b]	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}

Обозначения: *D* — дисперсная фаза (воздух, ТАГ или вода); *C* — дисперсионная среда.
[a] Растворимость CO_2 при давлении 1 бар составляет около 100% об.
[b] Характеристическое время пенообразования.

13.7.1. Пенообразование. Краткие сведения

В принципе пены получают двумя способами: перенасыщением или с помощью механических воздействий.

13.7.1.1. Перенасыщение

Газ (обычно CO_2 или N_2O из-за их хорошей растворимости) растворяется в водной фазе при высоком давлении (несколько бар). После сброса давления образуются пузырьки газа (без нуклеации); спонтанно образованный газовый пузырек имеет начальный радиус около 2 нм, что предполагает давление Лапласа (см. уравнение 13.8) около 10^8 Па (10^3 бар). Для этого газ должен находиться под соответствующим давлением, что, конечно, практически неприемлемо. Вместо этого газовые пузырьки всегда вырастают из небольших воздушных карманов, уже имеющихся в стенке сосуда или на небольших частицах. Для достаточно гидрофобного твердого тела краевой угол в системе газа, воды и твердого тела может достигать 150°, что позволяет оставаться небольшим воздушным карманам в трещинах или углублениях твердого тела (см. рис. 13.7, *б*). В случае отрицательной кривизны воздух может там оставаться, даже если он еще не совсем насыщен. Например, после вскрытия герметичной емкости с газированной жидкостью избыточное давление сбрасывается, CO_2 становится перенасыщенным и диффундирует к любым имеющимся воздушным карманам. Они, соответственно, увеличиваются и, становясь достаточно большими, смещаются, оставляя остаток, из которого может вырасти следующий пузырек. Пузырьки газа поднимаются, продолжая расти, и таким образом образуется слой пузырьков, то есть пена. Такие пузырьки всегда имеют довольно большой размер (например, 1 мм).

Еще одним примером может служить образование CO_2 в тесте при расстойке. Избыточный CO_2 накапливается в местах улавливания небольших пузырьков воздуха, и эти участки увеличиваются в размере. Некоторые из них вырастают до образования видимых пор, создающих макроскопическую структуру пены.

13.7.1.2. Применение механических воздействий

Поток газа может поступать в водную фазу через узкие отверстия (барботирование) с образованием пузырьков (довольно крупных, размером обычно более 1 мм). Пузырьки меньшего размера можно получить путем «вбивания» воздуха в жидкость. При этом сначала образуются крупные пузырьки, которые постепенно разбиваются на более мелкие. Усилия сдвига, как правило, слишком малы для получения небольших пузырьков, и механизм дробления обычно включает пульсации давления в турбулентном поле, как и в случае образования эмульсий типа «масло-в-воде» (см. раздел 13.6.2). Таким способом можно получить пузырьки размером около 100 мкм, причем размер самых мелких может достигать 20 мкм.

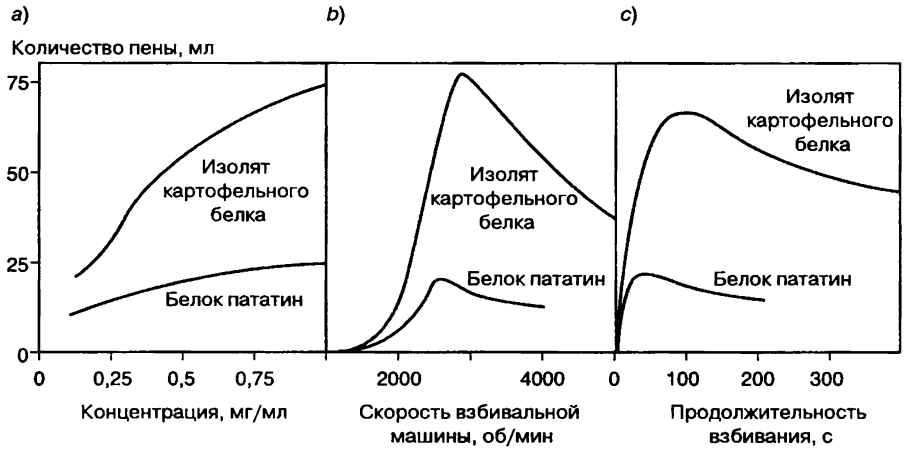


Рис. 13.34. Количество пены, полученной из разбавленных растворов изолята картофельного белка и очищенного пататина, при pH 7,0 и ионной силе 0,05 М: *a* — влияние концентрации белка; *b* — влияние скорости взбивателя (об/мин); *c* — влияние продолжительности взбивания. По Walstra P. *Physical Chemistry of Foodsю* — NY: Marcel Dekker, 2003

В пищевой промышленности используют преимущественно взбивание. Если оно проводится в открытой системе (например, при взбивании яичного белка в чаше), то основными конечными параметрами этого процесса являются средний размер пузырьков газа и объемная доля внедренного газа ϕ. Величину последней обычно выражают в виде показателя взбитости, равного $100\phi/(1-\phi)$. Факторы, определяющие взбитость, изучены еще не достаточно, и поэтому здесь мы не будем рассматривать все аспекты, а ограничимся лишь иллюстрацией некоторых важных переменных (рис. 13.34). Эти же переменные влияют на конечный размер пузырьков газа. Как правило, чем выше скорость взбивания и концентрация ПАВ, тем меньше эти пузырьки. В промышленной практике обычно применяют замкнутые системы, что позволяет измерить количества жидкости и газа и затем определить взбитость (при условии, что внесено достаточно ПАВ).

Для пенообразования необходимо иметь ПАВ почти любого типа, поскольку единственным критерием его функциональности является создаваемый γ-градиент. Как мы покажем далее, это отнюдь не означает, что для приготовления стабильной пены пригодно любое ПАВ. Более того, именно молярная концентрация ПАВ определяет взбитость, а это означает, что массовая концентрация белков должна быть выше, чем низкомолекулярных амфифилов.

В пищевой промышленности в качестве пенообразователей предпочитают использовать белки — они съедобны и обычно дают относительно стабильную пену. Как видно на рис. 13.34, *a*, важной переменной является концентрация белка, и для получения высокой взбитости необходимы очень большие его концентрации. Одной из причин, почему яичный белок является отличным пенообразователем, является то, что в нем содержится 10% белка. 5%-ный раствор неденатурированного сывороточного белка может обеспечить взбитость до 1000%. Тем не менее, между белками существуют значительные различия по концентрации, необходимой для получения заданной взбитости. Некоторые полученные гидролизом белка пептиды могут дать более высокую взбитость, чем собственно белок в той же массовой концентрации, но зачастую при этом существенно снижается физическая стойкость пены. Практика показывает, что смеси белков или белков и пептидов как пенообразователи лучше, чем большинство чистых белков.

13.7.1.3. Изменение структуры пены

Стадии пенообразования после образования начальных пузырьков показаны на рис. 13.35. Сразу после прекращения взбивания пузырьки быстро поднимаются, образуя слой пены (если вязкость жидкости не очень велика). Вскоре подъемная сила становится достаточной для взаимной деформации пузырьков, приводящей к образованию плоских ламелл (тонких пластинок) между ними. Напряжение, создаваемое подъемной силой, равно примерно $\rho_{воды}\, g\, H$, где H — высота слоя пены, то есть при $H = 1$ см оно составляет около 100 Па. Тем не менее, при соприкосновении сферических пузырьков возникает заметная

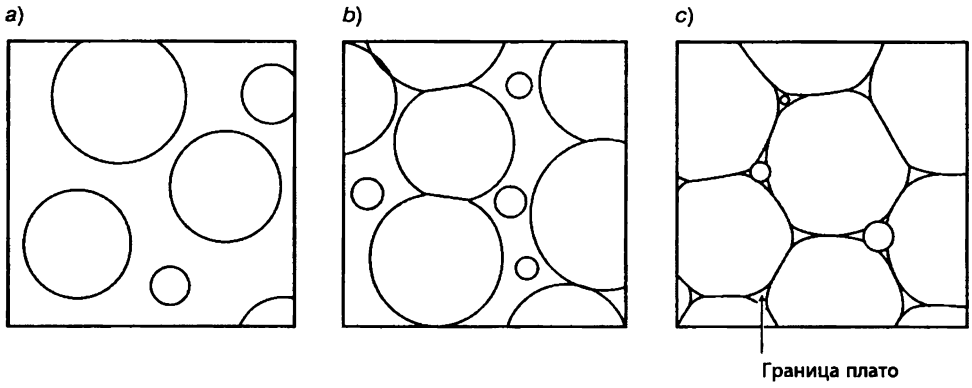


Рис. 13.35. Последовательные стадии (*a*, *b* и *c*) образования полиэдрической пены после создания пузырьков. Толщина ламелл между пузырьками слишком мала и в этом масштабе (диаметр пузырьков <1 мм) неразличима

концентрация напряжений, а это означает, что пузырьки с давлением Лапласа около 10^3 Па будут значительно расплющиваться. Дальнейшая утечка промежуточной жидкости (дренирование пены) вынуждает пузырьки принимать полиэдрическую форму. Там, где встречаются три ламеллы (более трех их не бывает, поскольку такая конформация будет нестабильной), образуется призмообразный объем воды, ограниченный цилиндрическими поверхностями. Этот структурный элемент называют «границей плато». Как правило, в результате созревания Оствальда остаточные небольшие пузырьки вскоре исчезают. Таким образом, образуется довольно регулярная полиэдрическая пена, несколько напоминающая сотовую конструкцию. В нижней части слоя пены пузырьки остаются более или менее сферическими.

По мере продолжения дренирования пены объемная доля воздуха в ней возрастает и ниже пены образуется слой жидкости. Лапласово давление в границах плато ниже, чем в ламеллах, так что жидкость мигрирует к ним. Поскольку границы плато взаимосвязаны, они обеспечивают пути для утечки жидкости. При дальнейшей утечке жидкости величина ϕ может легко достигнуть значения 0,95, соответствующего взбитости 1900%. Такая пена как пищевой продукт не очень привлекательна. Во избежание чрезмерного дренирования пены в нее можно вносить небольшие частицы наполнителя, но они должны быть гидрофильными, иначе может происходить значительная коалесценция пузырьков (см. раздел 13.7.2.3). Хорошо работают небольшие капельки эмульсии, покрытые белком, вносимые в некоторые взбитые топпинги.

Другой подход связан с гелеобразованием водной фазы. Его применяют во многих аэрированных пищевых продуктах типа пирожных безе, меренг, взбитых омлетов, десертов «баварский крем» (*bavarois*), хлебобулочных изделий, тортов и пирожных. Обеспечивая гелеобразование на ранней стадии, можно получить пену со сферическими пузырьками, другими словами «пузырьковую» или «мокрую» пену вместо полиэдрической или «сухой».

Собственно полиэдрическую пену можно считать гелем. Деформация пены вызывает увеличение кривизны пузырьков, соответствующее увеличение давления Лапласа и упругое поведение при небольшой деформации. При увеличении напряжения пузырьки «скользят» друг по другу, и наблюдается вязкоупругая деформация. Таким образом, существует очевидный предел текучести (см. раздел 13.5.1), поскольку даже большой объем пены может сохранять свою форму под действием своего веса. Предел текучести при этом обычно выше 100 Па.

13.7.2. Нестабильность пен

Нестабильность пен бывает трех основных типов:

- созревание Оствальда (диспропорционирование), представляющее собой диффузию газа из мелких пузырьков в более крупные (или в атмосферу), поскольку давление в мелком пузырьке больше, чем в большом;

  дренирование жидкости через слой пены под воздействием силы тяжести;
- коалесценция пузырьков вследствие нестабильности пленки между ними.

Эти изменения в некоторой степени взаимосвязаны: дренирование может способствовать коалесценции, а созревание Оствальда, так же как коалесценция могут усиливать дренирование жидкости.

Как мы покажем далее, эти типы нестабильности обусловлены принципиально разными факторами. К сожалению, во многих работах по изучению стабильности пен эти три типа нестабильности не дифференцируют (одной из причин может быть отсутствие методов, пригодных для мониторинга распределения размера пузырьков).

13.7.2.1. Созревание Оствальда

Научные основы созревания Оствальда описаны в разделе 13.2. Это явление, как правило, является наиболее важным типом нестойкости пены, особенно в тех пищевых продуктах, где размер пузырьков по сравнению со многими другими пенами относительно невелик. Через несколько минут после момента пенообразования обычно происходит заметное «огрубление» распределения размера пузырьков, причем наиболее быстро это происходит в верхней части слоя пены, поскольку воздух может диффундировать прямо в атмосферу, а слой воды между пузырьком и атмосферой очень тонок. Вместе с тем и внутри пены скорость созревания Оствальда может быть весьма значительной.

Классический анализ скорости созревания Оствальда, основанный на уравнении (13.9) и законах диффузии, представлен в работе [17], где рассматривается небольшой пузырек радиуса r_0, окруженный пузырьками значительно большего размера со средним расстоянием между ними Δ. В этом случае изменение радиуса пузырька в зависимости от времени t описывается уравнением

$$r^2(t) = r_0^2 - (RTDs_\infty \gamma / p\delta)t, \tag{13.31}$$

где D — коэффициент диффузии газа в воде, м^2/с; s_∞ — растворимость для $r = \infty$ (так как растворимость газа пропорциональна его давлению, она указывается в моль/(м^3·Па); γ — межфазное натяжение (обычно около 0,05 Н/м); p — атмосферное давление (обычно 10^5 Па).

Из уравнения 13.31 следует, что с уменьшением размера пузырек сжимается быстрее. Более того, сжатие происходит быстро из-за больших значений γ и растворимости большинства газов в воде. Это можно проиллюстрировать следующими примерами. Пузырек азота в воде при радиусе 0,1 мм и $\Delta = 1$ мм исчезнет примерно через 3 мин, а такой же пузырек CO_2 — через 4 с. Это не совсем соответствует действительности, так как геометрические предположения, лежащие в основе уравнения (13.31), на практике полностью не выполняются, а также вследствие того, что в присутствии смеси газов (например, воздуха) процесс происходит несколько медленнее. Кроме того, поскольку самые мелкие остаточные пузырьки становятся крупнее, скорость изменения со временем снижается. Тем не менее, созревание Оствальда может происходить весьма быстро.

Можно ли остановить или замедлить созревание Оствальда? При сжатии пузырька площадь его поверхности уменьшается, а поверхностная нагрузка (Г) увеличивается (если ПАВ не десорбируется). В отсутствие десорбции значение γ снижается и, соответственно, уменьшается давление Лапласа, а это означает, что движущая сила созревания Оствальда становится меньше. Оно даже прекращается, если поверхностный дилатационный модуль (E_{SD}), который является мерой изменения γ при изменении площади (см. уравнение 13.10), станет почти равным γ. Тем не менее, ПАВ обычно десорбируется, и поэтому E_{SD} уменьшается со скоростью, зависящей от нескольких факторов, особенно от типа ПАВ. В пене, приготовленной с использованием низкомолекулярных ПАВ, десорбция происходит легко, и замедление созревания Оствальда, как правило, незначительно. Белки обычно десорбируются медленно (см. раздел 13.2.2), и E_{SD} может оставаться довольно большим (см. раздел 13.2.6), особенно если газ — это CO_2. При этом созревание Оствальда существенно замедлится [57], несмотря на то что сжимающиеся пузырьки (и капли эмульсии) также могут разрушаться («схлопываться») [22, 45, 51]. Если газ — это воздух или азот, то созревание Оствальда идет намного медленнее — E_{SD} остается низким, и созревание Оствальда по существу не замедляется.

Некоторые белки образуют на поверхности раздела «воздух–вода» вязкие слои из-за реакции перекрестной сшивки адсорбированных молекул. Особенно хорошим стабилизатором пены является яичный белок. При его взбивании происходит сильная поверхностная денатурация, приводящая к образованию довольно крупных белковых агрегатов, которые необратимо адсорбируются, что обеспечивает высокую

стойкость к созреванию Оствальда. Нечто подобное может происходить и в случае твердых частиц с подходящим краевым углом (см. рис. 13.6). Примером могут служить «частично твердые» жировые глобулы во взбитых сливках, полностью покрывающие пузырьки воздуха и образующие пространственную сетку во всей системе (см. раздел 13.6.5).

Многие сложные пищевые системы содержат некоторое количество твердых частиц, мелких и достаточно гидрофильных, которые действуют аналогичным образом. Сжатие пузырька происходит до тех пор, пока адсорбированные твердые частицы не касаются друг друга. После этого остается небольшой, но стабильный пузырек. Считается, что это является причиной образования многих нежелательно стойких пен. Другим примером могут служить поры в тесте, заполненные газом [76], которые подвергаются интенсивному созреванию Оствальда, и количество видимых пор в готовом изделии составляет менее 1% от количества первоначальных. Это отнюдь не означает, что все другие исчезли — на самом деле многие крошечные поры, предположительно стабилизированные твердыми частицами, сохраняются. Эти поры не видны, но они достаточно рассеивают свет, придавая тем самым мякоти хлеба белизну.

Следует упомянуть, что предотвратить созревание Оствальда можно с помощью придания водной фазе предела текучести, но последний должен быть большим, около 10^4 Па. Примером может служить пористый шоколад.

13.7.2.2. Дренирование

Как мы уже отмечали в разделе 13.2.6, для предотвращения почти мгновенного дренажа необходима иммобилизация поверхности раздела «воздух–вода» с помощью γ-градиента (см. рис. 13.9, *c* и *d*). Максимальная высота вертикальной пленки (ламеллы) между двумя пузырьками без движения поверхностей пленки задается выражением

$$H_{max} = \frac{2\Delta\gamma}{\rho g \delta}. \tag{13.32}$$

Максимальное значение, которое может принимать Δγ (между верхней и нижней поверхностью вертикальной пленки), равно поверхностному давлению П, составляющему около 0,03 Н/м. Для пленки воды толщиной Δ = 0,1 мм H_{max} равна 6 см, то есть намного больше, чем требуется в пищевых пенах (6 см — это, конечно, примерная высота наиболее крупных пузырьков пены в моющем растворе).

Время дренирования одиночной вертикальной пленки с иммобилизированными поверхностями примерно равно:

$$t(\delta) \approx \frac{6\eta H}{\rho g \delta^2}, \tag{13.33}$$

где $t(\Delta)$ — время, необходимое для дренирования (высыхания) пленки до заданной толщины Δ. Для достижения толщины 10 мкм водной пленке высотой 1 мм требуется лишь 6 с дренирования. Тем не менее, скорость дренирования с уменьшением толщины снижается, и чтобы достигнуть Δ = 20 нм, потребуется 17 сут дренирования. Последняя величина Δ — это примерная толщина, при которой начинают действовать силы притяжения Ван-дер-Ваальса между двумя поверхностями пленки.

Прогнозировать скорость дренирования реальной пены значительно труднее, и здесь невозможно провести точный расчет. Уравнение (13.33) можно использовать для получения примерных значений с точностью до порядка величин. Естественно, дренирование можно значительно замедлить за счет увеличения вязкости. Для этой цели вязкость следует измерять при достаточно малом напряжении сдвига. Дренирование также можно замедлить при использовании предела текучести около $g H \rho_{воды}$ (H — высота слоя пены).

13.7.2.3. Коалесценция

Коалесценция происходит при разрыве пленки между пузырьками, однако ее механизм зависит от конкретной ситуации. Выделяют три основных случая.

Толстые пленки. Если пленки достаточно толстые, то коллоидным взаимодействием между двумя поверхностями можно пренебречь. В этой ситуации важен стабилизирующий механизм Гиббса (см. раздел 13.2.6 и рис. 13.9, *e*). Разрыв пленки и, следовательно, коалесценция пузырьков возможны только

при очень низкой концентрации ПАВ. Если пленка сильно растягивается, что всегда происходит в ходе взбивания, то пленка легче разрывается. Конечно, для пенообразования имеется некоторая оптимальная скорость взбивания (см. рис. 13.34, *b*), то есть та скорость, при которой достигается наибольшее насыщение воздухом.

Тонкие пленки. Если пленки достаточно тонкие, то следует учитывать коллоидные взаимодействия. В этом случае применим анализ, изложенный в разделе 13.6.4 (см. также рис. 13.30). В отсутствие сильных сил коллоидного отталкивания, поддерживающих толщину пленки, может легко произойти ее разрыв. Тем не менее, для дренирования (высыхания) пленки до малой толщины может потребоваться много времени. С другой стороны, вода из пленки может испариться, особенно в верхнем слое пены. Следовательно, разрыв пленки будет происходить, главным образом, в верхнем слое пены, что приведет к уменьшению ее высоты. По сравнению с эмульсиями пены значительно менее стойки к коалесценции: значение γ велико (стойкость больше); пленки между пузырьками «постоянные» (стойкость меньше); площадь пленки очень велика (стойкость меньше) и, кроме того, чтобы коалесценция стала значительной, должно разорваться гораздо меньше пленок (см. табл. 13.7). Наиболее стойкие пленки дают белки, особенно если они образуют толстые адсорбированные слои.

Пленки, содержащие посторонние частицы. Зачастую присутствие посторонних частиц, в особенности липидов, очень негативно сказывается на стойкости пены. Такие частицы могут вызывать разрыв относительно толстых пленок. Для объяснения этого предложено несколько возможных механизмов [28]. Считается, что доминирующую роль играет растекание жидкой масляной фазы по поверхности «воздух–вода». Покрытые белком капли масла имеют гидрофильный поверхностный слой, препятствующий растеканию масляной фазы по поверхности «воздух–вода». Тем не менее, если это касается жировых глобул, то есть капель масла с кристаллами ТАГ, масло может легко достичь поверхности раздела «воздух–вода» (ср. с ролью таких кристаллов в частичной коалесценции, раздел 13.6.5). Крупные жировые глобулы являются весьма эффективными антивспенивателями. Известно, например, что для стабильности пивной пены вредны следы помады. Еще одним примером может служить обезжиренное молоко, содержащее лишь 0,05% жира и очень мелкие жировые глобулы — заставить такое молоко вспениваться гораздо легче, чем цельное молоко.

В связи с этим следует рассмотреть концентрацию посторонних частиц. Типичная пищевая пена в 1 м^3 жидкой фазы может содержать 10^{12} ламелл. Считается, что для значительной коалесценции пузырьков достаточно 10^{12} частиц в 1 м^3 (при условии, что эти частицы могут вызвать разрыв пленки). Такими частицами могут быть крупные глобулы молочного жира (диаметром около 6 мкм), содержащие жидкую и твердую жировые фазы. 10^{12} таких шариков в 1 м^3 соответствуют примерно 0,01% жира, то есть очень небольшое их количество может привести к значительной коалесценции.

В типичных взбитых сливках количество частично твердых жировых глобул очень велико (не менее 10^{16} в 1 м^3). Многие из этих глобул способны вызвать разрыв пленки. Тем не менее, их большая концентрация на очень близком расстоянии друг от друга вызывает почти одновременную адсорбцию многих глобул. Растекание жидкой масляной фазы на любое расстояние в этом случае невозможно и разрыв пленки будет происходить редко, благодаря чему образуется стойкая и довольно твердая пена. Тем не менее, если продолжить взбивание, то жировые глобулы подвергнутся интенсивной частичной коалесценции с образованием больших комков. В конечном счете их количество станет настолько мало, что может произойти разрыв пленки. Другими словами, чрезмерное взбивание разрушает ранее образовавшуюся пену. При взбивании сливок в масло, то есть для получения больших скоплений жировых глобул, это делают намеренно.

Использованные обозначения

A	(Удельная) площадь поверхности	($м^{-1}$, $м^2$)
	Постоянная Хамакера	(Дж)
a	Термодинамическая активность	(мольная доля)
	Ускорение	($м \cdot с^{-2}$)
B	Проницаемость	($м^2$)
c	Концентрация	($кг \cdot м^{-3}$; $моль \cdot м^{-3}$; $моль \cdot л^{-1}$)
D	Коэффициент диффузии	($м^2 \cdot с^{-1}$)
	Фрактальная размерность	(–)
d	Диаметр частицы	(м)
E_{SD}	Поверхностный дилатационный модуль	($Н \cdot м^{-1}$)
F	Свободная энергия (Гиббса)	(Дж; $Дж \cdot моль^{-1}$)
f	Сила	(Н)
G	Модуль упругого сдвига	(Па)
g	Ускорение силы тяжести	(9,81 $м \cdot с^{-2}$)
H	Высота	(м)
	Энтальпия	(Дж; $Дж \cdot моль^{-1}$)
h	Межчастичное расстояние	(м)
	Ионная сила	($моль \cdot л^{-1}$)
k	Постоянная Больцмана	($1{,}38 \cdot 10^{-23}$ $Дж \cdot К^{-1}$)
l	Расстояние, длина	(м)
m	Концентрация	($моль \cdot л^{-1}$)
N	(Общая) концентрация частиц	($м^{-3}$)
n_i	Количество частиц в классе i	($м^{-3}$)
p	Давление	(Па)
p_L	Давление Лапласа	(Па)
Q	Объемная скорость течения	($м^3 \cdot с^{-1}$)
R	Универсальная газовая постоянная	(8,314 $Дж \cdot моль^{-1} \cdot К^{-1}$)
	Радиус агрегата	(м)
R_{cr}	Критический радиус	(м)
R_g	Радиус инерции	(м)
r	Радиус частицы	(м)
S	Энтропия	(Дж $К^{-1}$; $Дж \cdot моль^{-1} \cdot К^{-1}$)
s	Растворимость газа	($мольмм^{-3} \cdot Па^{-1}$)
T	(Абсолютная) температура	(К)
t	Время	(с)
$t_{0,5}$	Время сокращения (уменьшения) вдвое	(с)
V	Свободная энергия взаимодействия	(Дж)
v	Скорость	($м \cdot с^{-1}$)
v_S	Стоксова скорость частицы	($м \cdot с^{-1}$)
∇v	Градиент скорости; скорость сдвига	($с^{-1}$)
W	Отношение стабильности	(–)
x	Расстояние	(м)
z	Валентность	(–)

Греческие символы

Γ	Поверхностная нагрузка	($моль \cdot м^{-2}$, $кг \cdot м^{-2}$)
γ	Поверхностное/межфазное натяжение	($Н \cdot м^{-1}$)
Δ	Толщина слоя (пленки)	(м)
ε	Деформация (относительная деформация)	(–)

ε_{fr}	Разрушающая деформация	(–)
θ	Краевой угол	(рад)
$1/\kappa$	Дебаевская длина	($м^{-1}$)
η	Вязкость	(Па · с)
η_a	Кажущаяся вязкость	(Па · с)
Π	Поверхностное давление	($Н \cdot м^{-1}$)
Π_{osm}	Осмотическое давление	(Па)
ρ	Массовая плотность	($кгмм^{-3}$)
σ	Напряжение	(Па)
σ_{fr}	Разрушающее напряжение	(Па)
σ_y	Предел текучести	(Па)
ϕ	Объемная доля	(–)
Ψ	Доля твердого вещества	(–)
	Электрический потенциал	(В)

Нижние индексы

- *A* Воздух
- *C* Дисперсионная среда
- *D* Дисперсная фаза
- *O* Масло
- *S* Твердое тело (вещество)
- *W* Вода (водная фаза)

Дополнительная литература

Blanshard J. M. V., Lillford P., eds. *Food Structure and Behaviour/* — London: Academic Press, 1987.
Blanshard J. M. V., J. R. Mitchell, eds. *Food Structure, Its Creation and Evaluation.* — London: Butterworth, 1988.
Dickinson E. *An Introduction into Food Colloids.* — Oxford: Oxford Science, 1992.
Friberg S. E., Larsson K., Sjoblom J., eds. *Food Emulsions.* — 4th ed. — NY: Marcel Dekker, 2004.
Hill S. E., Ledward D. A., Mitchell J. R., eds. *Functional Properties of Food Macromolecules.* — 2nd ed. — Gaithersburg, MD: Aspen, 1998.
Walstra P. *Physical Chemistry of Foods.* — NY: Marcel Dekker, 2003.

Литература

1. Adamson A. W., Gast A. P. *Physical Chemistry of Surfaces.* — 6th ed. — NY: John Wiley, 1997.
2. Allen T. *Particle Size Measurement.* — 3rd ed. — London: Chapman & Hall, 1981.
3. Baszkin A., Norde W. (eds). *Physical Chemistry of Biological Interfaces.* — NY: Dekker, 2000.
4. Benjamins J., Lucassen-Reynders E. H. Surface dilational rheology of proteins adsorbed at air/water and oil/water interfaces // *Studies in Interface Science* / D. Mobius, R. Miller (eds.). — Amsterdam: Elsevier, 1988. — P. 341–384.
5. Benjamins J., Lucassen-Reynders E. H. Static and dynamic properties of proteins adsorbed at three different liquid interfaces // *Food Colloids, Biopolymers and Materials* / E. Dickinson, T. van Vliet (eds.). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. — P. 216–225.
6. Boode K., Walstra P. Kinetics of partial coalescence in oil-in-water emulsions // *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties* / E. Dickinson, P. Walstra (eds.). — Cambridge: Royal Society Chemistry, 1993. — P. 23–30.
7. Boode K., Walstra P. Partial coalescence in oil-in-water emulsions. 1. Nature of the aggregation // *Colloids Surf.*, 1993, 81, p. 121–137.
8. Boode K., Walstra P., de Groot-Mostert A. E. A. Partial coalescence in oil-in-water emulsions. 2. Influence of the properties of the fat // *Colloids Surf.*, 1993, 81, p. 139–151.
9. Bremer, L.G. B., Walstra P., van Vliet T. Estimation of the aggregation time of various colloidal systems // *Colloids Surf. A*, 1995, 99, p. 121–127.
10. Brownsey G. J., Morris V. J. Mixed and filled gels — models for foods // *Functional Properties of Food Macromolecules* / J. R. Mitchell, D. A. Ledward (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1988. — P. 7–23.
11. Busnell J. R., Clegg S. M., Morris E. R. Melting behaviour of gelatin: origin and control // *Gums and Stabilizers for the Food Industry* / G. O. Phillips, D. J. Wedlock, P. A. Williams (eds). — Vol. 4. — Oxford: IRL Press, 1988. — P. 105–115.

12. Clark A. H., Lee-Tufnell C. D. Gelation of globular proteins // *Functional Properties of Food Macromolecules* / J. R. Mitchell, D. A. Ledward (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1986. — P. 203–272.
13. Coffey D. G., Bell D. A., Henderson A. Cellulose and cellulose derivatives // *Food Polysaccharides and Their Applications* / A. M. Stephen (ed.). — NY: Dekker, 1995. — P. 123–153.
14. Darling D. F. Recent advances in the destabilization of dairy emulsions // *J. Dairy Res.* 1982, 49, p. 695–712.
15. De Feijter J. A., Benjamins J., Tamboer M. Adsorption displacement of proteins by surfactants in oil-in-water emulsions // *Colloids Surf.* 1987, 27, p. 243–266.
16. De Roos A. L., Walstra P. Loss of enzyme activity due to adsorption onto emulsion droplets // *Colloids Surf. B,* 1996, 6, p. 201–208.
17. De Vries A. J. Foam stability. II. Gas diffusion in foams // *Receuil Trav. Chim.,* 1958, 77, p. 209–225.
18. Dickinson E. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relation to emulsion stability // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.,* 1992, 88, p. 2973–2983.
19. Dickinson E. Protein-stabilized emulsions // *J. Food Eng.,* 1994, 22, p. 59–74.
20. Dickinson E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems // *Food Hydrocoll.,* 2003, 17, p. 25–39.
21. Dickinson E., Eriksson L. Particle flocculation by adsorbing polymers // *Adv. Colloid Interf. Sci.,* 1991, 34, p. 1–29.
22. Dickinson E., Ettelaie R., Murray B. S., Du Z. Kinetics of disproportionation of air bubbles beneath a planar air-water interface stabilized by food proteins // *J. Colloid Interf. Sci.,* 2002, 252, p. 202–213.
23. Dickinson E., Galazka V. B., Anderson D. M. W. Emulsifying behaviour of gum Arabic. Part 1: Effect of the nature of the oil phase on the emulsion Droplet-size distribution // *Carbohydr. Polym.,* 1991, 14, p. 373–383.
24. Dickinson E., Matsumura Y. Time-dependent polymerization of β-lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions // *Int. J. Biol. Macromol.,* 1991, 13, p. 26–30.
25. Dickinson E., Murray B. S., Stainsby G. Coalescence stability of emulsion-sized Droplets at a planar oil-water interface and the relation to protein film surface rheology // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1,* 1988, 84, p. 871–883.
26. Fleer G. J., Cohen Stuart M. A., Scheutjens J. M. H. M., Cosgrove T., Vincent B. *Polymers at Interfaces.* — London: Chapman & Hall, 1993.
27. Friberg S. E., Goubran R. F., Kayali I. H. Emulsion stability // *Food Emulsions* / K. Larsson, S. E. Friberg (eds). — 2nd ed. —NY: Dekker, 1990. — P. 1–40.
28. Garrett P. R. Recent developments in the understanding of foam generation and stability // *Chem. Eng. Sci.,* 1993 48, p. 367–392.
29. Graham D. E., Phillips M. C. Proteins at liquid interfaces. IV. Dilational properties // *J. Colloid Interf. Sci.,* 1980, 76, p. 227–239.
30. Hermansson A.-M. Gel structure of food biopolymers // *Functional Properties of Food Macromolecules* / J. R. Mitchell, D. A. Ledward (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1988. — P. 25–40.
31. Hough D. B., White L. R. The calculation of Hamaker constants from Lifshitz theory with application to wetting phenomena // *Adv. Colloid Interf. Sci.,* 1980, 14, p. 3–41.
32. Hutchings J. B., Lillford P. J. The perception of food texture; the philosophy of the breakdown path // *J. Texture Studies,* 1988, 19, p. 103–115.
33. Kato A., Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescent probe method and its correlation with surface properties of proteins // *Biochim. Biophys. Acta,* 1980, 624, p. 13–20.
34. Kimura H., Morikata S., Misaki M. Polysaccharide 13140: a new thermo-gelable polysaccharide // *J. Food Sci.,* 1973, 38, p. 668–670.
35. Krog N. J. Food emulsifiers and their chemical and physical properties // *Food Emulsions* / K. Larsson, S. E. Friberg (eds). — 2nd ed. — NY: Dekker, 1990 — P. 127–180.
36. Larsson K., Dejmek P. (1990), Crystal and liquid crystal structure of lipids // *Food Emulsions* / K. Larsson, S. E. Friberg (eds). — 2nd ed. — NY: Dekker, 1990 — P. 97–125.
37. Ledward D. A. Gelation of gelatin // *Functional Properties of Food Macromolecules* / J. R. Mitchell, D. A. Ledward (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1986 — P. 171–201.
38. Ledward D. A., Mitchell J. R. Protein extrusion — more questions than answers? // *Food Structure — Its Creation and Evaluation* / J .M. V. Blanshard, Mitchell J. R. (eds). — London: Butterworths, 1988. — P. 219–229.
39. Lucassen-Reynders E. H. Surface elasticity and viscosity in compression/dilation // *Anionic Surfactants: Physical Chemistry of Surfactant Action* / E. H. Lucassen-Reynders (ed.). — NY: Dekker, 1981. — P. 173–216.
40. Luyten H. van Vliet T. Influence of a filler on the rheological and fracture properties of food materials // *Rheology of Foods, Pharmaceutical and Biological Materials with General Rheology* / R. E. Carter (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1990. — P. 43–56.
41. Luyten H., van Vliet T., Kloek W. Sedimentation in aqueous xanthan+galactomannan mixtures // *Food Polymers, Gels and Colloids* / E. Dickinson (ed.). — Cambridge: Royal Society Chemistry, 1991. — P. 527–530.
42. Lyklema J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science. Vol. I, Fundamentals.* —London: Academic Press, 1991. — P. A9.1–9.7.

43. Lyklema J. (ed.). *Fundamentals of Interface and Colloid Science. Vol. IV, Paniculate Colloids.* — London: Elsevier Academic Press, 2005. — P. A3.1–A3.9.
44. Martin A., Bos M., Cohen Stuart M., van Vliet T. Stress-strain curves of adsorbed protein layers at the air/water interface measured with surface shear rheology // *Langmuir,* 2002, 18, p. 1238–1243.
45. Meinders M. B. J., van Vliet T. The role of interfacial rheological properties on Ostwald ripening in emulsions // *Adv. Colloid Interf. Sci.,* 2004, p. 108–109; 119–126.
46. Mellema M., van Opheusden J. H. J., van Vliet T. Categorization of rheological scaling models for particle gels applied to casein gels // *J. Rheol.,* 2002, 46, p. 11–29.
47. Mellema M., Walstra P., van Opheusden J. H. J., van Vliet T. Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels // *Adv. Colloid Interf. Sci.,* 2002, 98, p. 25–50.
48. Morris V. J. Gelation of polysaccharides // *Functional Properties of Food Macromolecules* / J. R. Mitchell, D. A. Ledward (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1986. — P. 121–170.
49. Morris V. J. Designing polysaccharides for synergistic interactions // *Gums and Stabilizers for the Food Industry. Vol.* 6 / G. O. Phillips, P. A. Williams, D. J. Wedlock (eds). — Oxford: IRL Press, 1992. — P. 161–172.
50. Muhr A. H., J. M. V. Blanshard. Diffusion in gels // *Polymer,* 1982, 23(suppl.), p. 1012–1026.
51. Mulder H., Walstra P. *The Milk Fat Globule: Emulsion Science as Applied to Milk Products and Comparable Foods.* — PUDOC, Wageningen and CAB, Farnham Royal, 1974.
52. Murray B. S., Dickinson E. Interfacial rheology and the dynamic properties of adsorbed films of proteins and surfactants // *Food Sci. Technol. Intern.,* 1996, 2, p. 131.
53. Norde W., Lyklema J. Why proteins prefer interfaces // *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.,* 1991, 2, p. 183–202.
54. Oguntunde A. O., Walstra P., van Vliet T. Physical characterization of soymilk // *Trends in Food Biotechnology* / Ang How Ghee (ed.). — Proceedings of the 7th World Congress Food Science Technology, 1987. — 1989. — P. 307–308.
55. Pearce K. N., Kinsella J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique // *J. Agric. Food Chem.,* 1978, 26, p. 716–723.
56. Prins A. Principles of foam stability // *Advances in Food Emulsions and Foams* / E. Dickinson, G. Stainsby (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1988. — P. 91–122.
57. Ronteltap A. D., Prins A. The role of surface viscosity in gas diffusion in aqueous foams. II. Experimental // *Colloids Surf.,* 1990, 47, p. 285–298.
58. Shama F., Sherman P. Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity // *J. Texture Studies,* 1973, 4, p. 103–118.
59. Shimizu M., Saito M., Yamauchi K. Hydrophobicity and emulsifying activity of milk proteins // *Agric. Biol. Chem.,* 1986, 50, p. 791–792.
60. Shinoda K., Kunieda H. Phase properties of emulsions: PIT and HLB // *Encyclopedia of Emulsion Technology. Vol 1. Basic Theory* / P. Becher (ed.). — NY: Dekker, 1983. — P. 337–367.
61. Smulders P. E. A., Caessens P. W. J. R. Walstra P. Emulsifying properties of β-casein and its hydrolysates in relation to their molecular properties // *Food Emulsions and Foams* / E. Dickinson, J. M. Rodriguez Patino (eds). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. — P. 61–69.
62. Spielman L. A. Hydrodynamic aspects of flocculation // *The Scientific Basis of Flocculation* / K. J. Ives (ed.). — Alphen aan den Rijn: Sijthoff & Noordhoff, 1978. — P. 63–88.
63. Stading M., Langton M., Hermansson A.-M. Inhomogeneous fine-stranded β-lactoglobulin gels // *Food Hydrocoll.,* 1992, 6, p. 455–470.
64. Stading M., Langton M., Hermansson A.-M. Microstructure and rheological behaviour of particulate β-lactoglobulin gels // *Food Hydrocoll.,* 1993, 7, p. 195–212.
65. Stauffer D., Coniglio A., Adam M. Gelation and critical phenomena // *Adv. Polym. Sci.,* 1982, 44, p. 105–107.
66. Stockham J. D., Fochtman E. G. *Particle Size Analysis.* — Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publication, 1977.
67. Tolstoguzov V. B. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures // *Functional Properties ofFood Macromolecules* / J. R. Mitchell, D. A. Ledward (eds). — London: Elsevier Applied Science, 1986. — P. 385–415.
68. Tolstoguzov V. B. Thermodynamic incompatibility of food macromolecules // *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties* / E. Dickinson, P. Walstra (eds). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. — P. 94–102.
69. Van Aken, G. A. Aeration of emulsions by whipping // *Colloids Surf.,* 2001, 190, p. 333–353.
70. Van Aken G. A. Flow-induced coalescence in protein-stabilized highly concentrated emulsions // *Langmuir,* 2002, 18, p. 3549–3556.
71. Van Aken G. A., Merks M. T. E. Dynamic surface properties of milk proteins // *Prog. Colloid Polymer Sci.,* 1994, 97, p. 281–284.
72. Van Boekel M. A. J. S., Walstra P. Stability of oil-in-water emulsions with crystals in the disperse phase // *Colloids Surf.,* 1981, 3, p. 109–118.
73. Van Kreveld A. Studies on the wetting of milk powder // *Neth. Milk Dairy J.,* 1974, 28, p. 23–45.
74. Van Vliet T. On the relation between texture perception and fundamental mechanical parameters for liquids and time-dependent solids // *Food Quality Pref.,* 2002, 13, p. 111–118.

75. Van Vliet T., van Dijk H. J. M., Zoon P., Walstra P. Relation between syneresis and rheological properties of particle gels // *Colloid Polym. Sci.* 1991, 269, p. 620–627.
76. Van Vliet T., Janssen A. M., Bloksma A. H., Walstra P. Strain hardening of dough as a requirement for gas retention // *J. Texture Studies,* 1992, 23, p. 439–460.
77. Van Vliet T, Roefs S. P. F. M., Zoon P., Walstra P. Rheological properties of casein gels // *J. Dairy Res.,* 1989, 56, p. 529–534.
78. Vincent J. F. V., Jeronimides G., Kahn A. A., Luyten H. The wedge fracture test: a new method for measurement of food texture // *J. Texture Studies,* 1991, 22, p. 45–57.
79. Visser J. On Hamaker constants: a comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van derWaals constants // *Adv. Colloid Interf. Sci.,* 1972, 3, p. 331–363.
80. Walstra P. Formation of emulsions // *Encyclopedia of Emulsion Technology. Vol. 1* / P. Becher (ed.). — NY: Dekker, 1983. — P. 57–127.
81. Walstra P. Fat crystallization // *Food Structure and Behaviour* / J. M. V. Blanshard, P. Lillford (eds). — London: Academic Press, 1987. — P. 67–85.
82. Walstra P. Principles of foam formation and stability // *Foams: Physics, Chemistry and Structure* / A. J. Wilson (ed.). — London: Springer, 1989. — P. 1–15.
83. Walstra P. Introduction to aggregation phenomena in food colloids // *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties* / E. Dickinson, P. Walstra (eds). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. — P. 1–15.
84. Walstra P. Syneresis of curd // *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1. General Aspects* / P. F. Fox (ed.). — London: Chapman & Hall, 1993. — P. 141–191.
85. Walstra P. Emulsion stability // *Encyclopedia of Emulsion Technology. Vol. 4* / P. Becher (ed.). — NY: Dekker, 1996 — P. 1–62.
86. Walstra P. The roles of proteins and peptides in formation and stabilisation of emulsions // *Gums and Stabilizers for the Food Industry. Vol. 11* / P. A. Williams, G. O. Phillips (eds). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. — P. 237–244.
87. Walstra P., de Roos A. L. Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects // *Food Rev. Intern.,* 1993, 9, p. 503–525.
88. Walstra P., Jenness R. *Dairy Chemistry and Physics.* — NY: Wiley, 1984.
89. Walstra P., Jonkman M. The role of milkfat and protein in ice cream // *Ice Cream* / W. Buchheim (ed.). — Brussels: International Dairy Federation, 1998. — P. 17–24.
90. Walstra P., Smulders I. Making emulsions and foams: an overview // *Food Colloids: Proteins, Lipids and Polysaccharides* / E. Dickinson, B. Bergenstahl (eds). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1997. — P. 367–381.
91. Walstra P., Smulders P. E. A. Emulsion formation // *Modern Aspects of Emulsion Science* / B. P. Binks (ed.). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. — P. 56–99.
92. Walstra P., van Vliet T., Bremer L.G. B. On the fractal nature of particle gels // *Food Polymers, Gels and Colloids* / E. Dickinson (ed.). — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991. — P. 369–382.
93. Wedzicha B. L. Distribution of low-molecular-weight food additives in dispersed systems // *Advances in Food Emulsions and Foams* / E. Dickinson, G. Stainsby (eds). — London: Elsevier, 1988, p. 329–371.

14. ФИЗИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ В ПИЩЕВЫХ СИСТЕМАХ

Здислав Э. Сикорски (*Zdzisfaw E. Sikorski*), Ян Покорны (*Jan Pokorny*), Шринивасан Дамодаран (*Srinivasan Damodaran*)
Перевод В. Д. Широкова под науч. ред. канд. техн. наук Е. А. Смирновой

Содержание

14.1. Введение. 782
14.2. Микроструктура пищевых продуктов. 783
14.2.1. Капли воды, жировые глобулы и полиморфные жировые фазы.. 783
14.2.2. Белковые фибриллы, листовые структуры и мицеллы 786
14.2.3. Гранулы и кристаллы. 787
14.3. Химические взаимодействия компонентов пищевых продуктов..... 790
14.3.1. Введение 790
14.3.2. Реакция Майяра. 790
14.3.2.1. Вещества и субстраты, участвующие в реакции 790
14.3.2.2. Механизм и продукты реакции Майяра. 790
14.3.2.3. Влияние условий реакции..... 796
14.3.2.4. Влияние на биологическую ценность.... 796
14.4. Реакции, протекающие при нагревании в щелочных условиях.. 797
14.5. Взаимодействия «вода–белок» и «белок–белок» 797
14.5.1. Вода в белковых структурах..... 797
14.5.2. Ингибирование роста кристаллов льда 798
14.5.3. Взаимодействия «белок–белок» 798
14.6. Взаимодействия между липидами и белками 798
14.7. Взаимодействия полисахаридов 799
14.8. Взаимодействия между полисахаридами и липидами. 800
14.9. Взаимодействия между полисахаридами и белками 801
14.10. Влияние химических и физических взаимодействий на цвет пищевых продуктов . 804
14.10.1. Изменения гемопротеинов..... 804
14.10.2. Взаимодействия каротиноидов..... 804
14.10.3. Взаимодействия антоцианов..... 804
14.10.4. Неферментативное потемнение и образование черных пятен 805
14.10.5. Обесцвечивание из-за связывания ионов металлов.. .. 805
14.11. Влияние химических и физических взаимодействий на вкус и аромат пищевых продуктов 806
14.11.1. Взаимодействия вкусоароматических соединений с основными компонентами пищевых продуктов..... 806
14.11.2. Гидролитические реакции 806
14.11.3. Окислительные реакции..... 807
14.12. Влияние химических и физических взаимодействий на текстуру и реологические свойства пищевых продуктов 807
14.12.1. Денатурация белков при замораживании ... 807
14.12.2. Поперечные сшивки в гелях .. 808
14.12.3. Образование биоразлагаемых пленок ... 808
14.12.4. Химические и физические взаимодействия в тесте и выпеченных хлебобулочных изделиях..... 809
Литература..... 810

14.1. Введение

Основными компонентами большинства пищевых продуктов являются вода, белки, углеводы, жиры (липиды), пищевые волокна, органические кислоты и минеральные вещества в различных соотношениях. Пищевые продукты также могут содержать большое количество других минорных компонентов и добавок, которые образуют структуру тканей, служат резервными источниками энергии и выполняют многочисленные биохимические функции в организмах живых растений и животных. Большинство компонентов пищевых продуктов химически активны или, по крайней мере, содержат различные реакционноспособные группы (табл. 14.1). Во многих случаях некоторые из этих групп не готовы к вступлению в реакции из-за возможных физических барьеров. Взаимодействия в пищевых продуктах зависят от химической природы этих функциональных групп, их компартментализации во внутренней структуре тканей и от условий внешней среды — температуры, значения pH, ионной силы и типа ионов (например, поливалентные катионы), активности воды, окислительно-восстановительного потенциала и вязкости жидкостей. Все эти условия изменяются в послеуборочный или послеубойный период, а также во время хранения сырья и в результате технологического процесса.

Таблица 14.1
Реакционноспособные группы компонентов пищевых продуктов

Реакционноспособные группы	Источник
–SH, –S–S–	Белки, пептиды и аминокислоты
$-NH_2$, –NH–C(=NH)NH_2	Белки, аминокислоты и другие содержащие амины соединения
–OH, –CHO, $R_2C{=}O$	Белки, углеводы и низкомолекулярные карбонильные соединения
$^1O_2$, $^{\cdot}O^-_2$, $^{\cdot}OH$, H_2O_2, $RO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, ROOH, $ArO^{\cdot}$, $ArOO^{\cdot}$	Продукты окисления липидов
–COOH, –O–SO_3H, –O–PO_3H_2	Белки, пектины и другие полисахариды
–CH=CH– , –CH=CH–CH_2–CH=CH–	Ненасыщенные жиры
$NO^{\cdot}$, $NO^{\cdot}_2$, O=N–OOH, O=N–OO^-	Добавки

Физические взаимодействия между различными компонентами зачастую приводят к изменениям физических и органолептических свойств пищевых продуктов, например:

разрыв клеточных мембран мышечной ткани рыб крупными кристаллами льда, образующимися в межклеточном пространстве при медленном замораживании, приводит к интенсивной потере сока в процессе размораживания филе (аналогичные процессы происходят также в замороженных фруктах и овощах);

избирательное разрушение клеток при помоле в контролируемых условиях приводит к разрыву клеток эндосперма зерна пшеницы, но оставляет почти неповрежденными крахмальные зерна и алейроновый слой, связанные с отрубями;

разрушение клеток фруктов, вызванное разными физиологическими процессами, сопровождается активацией пектиназ, полифенолоксидазы, целлюлаз и инвертазы. Эти ферментативные процессы обеспечивают формирование органолептических свойств, характерных для созревших фруктов.

Высокое гидростатическое давление в диапазоне 100–700 МПа способствует возникновению некоторых взаимодействий пищевых веществ, которые вызывают качественные изменения пищевых продуктов. Примерами таких изменений могут служить коагуляция яичного белка и желтка, потемнение мышечной ткани свежей рыбы, желатинизация и коагуляция рыбных саркоплазматических белков, денатурация и снижение растворимости β-лактоглобулина и (в меньшей степени) α-лактальбумина, разрушение мицелл казеина, изменения структуры саркомеров мяса, деполимеризация изолированных миофибриллярных белков, тендеризация мяса, инактивация некоторых эндогенных ферментов рыбы (включая ферменты, участвующие в послеубойном расщеплении высокоэнергетических фосфатов), ускорение окисления липидов в мышечной ткани рыбы, гидролиз и клейстеризация крахмала, а также кристаллизация молочно-

го жира. Степень этих изменений зависит от величины примененного высокого давления и других технологических параметров (главным образом от температуры, значения pH и длительности обработки) [1–3].

Физико-химические взаимодействия компонентов пищевого продукта обусловливают образование дисперсных систем, таких как эмульсии и пены, и реологические свойства различных продуктов. Они влияют на органолептические и технологические свойства пищевого сырья, в том числе на его характеристики текучести и сопротивление сдвигу. Химические реакции между компонентами играют важнейшую роль в формировании как положительных, так и нежелательных органолептических свойств, а также пищевой ценности пищевых продуктов. Следовательно, для управления и совершенствования качества пищевых продуктов необходимо полное понимание различных физико-химических взаимодействий между отдельными компонентами. Основные реакции, в которых участвуют белки, углеводы и липиды в процессе производства и хранения пищевых продуктов, приведены на рис. 14.1–14.3.

14.2. Микроструктура пищевых продуктов

В ходе химических и физических взаимодействий между компонентами пищевого продукта (водой, белками, липидами, углеводами, пищевыми волокнами, минеральными соединениями, растворенными и диспергированными газами) в натуральных и переработанных пищевых продуктах образуются макроскопические структуры. Примерами некоторых типичных структурных форм могут служить капли воды, жировые глобулы, фибриллы или нити, слоистые структуры («листы») или пленки, везикулы, мицеллы, гранулы, кристаллы и пузырьки [4]. В водных пищевых системах эти структуры стабилизируются ковалентными, ионными и водородными связями, а также гидрофобными взаимодействиями. Размер и форма таких структур, их стабильность, распределение и взаимодействия, зависящие от биохимического состояния исходного сырья, оказывают большое влияние на многие показатели качества, особенно на текстуру и внешний вид готовых пищевых продуктов.

14.2.1. Капли воды, жировые глобулы и полиморфные жировые фазы

В пищевых эмульсиях типа «вода-в-масле» (например, в сливочном масле, маргарине и спредах) присутствуют капли воды. В маргарине и сливочном масле содержание влаги составляет около 20%. Спреды содержат меньше жира (от 20 до 70%) и больше воды, так что их калорийность ниже, чем у маргарина. В сливочном масле диаметр капель воды составляет менее 10 мкм, тогда как в спредах он должен быть менее 5 мкм (для затруднения роста микроорганизмов). Дисперсионная среда маргариновой эмульсии представляет собой взаимосвязанную структуру из жидкой жировой фазы, кристаллов жира и слоев, образованных комплексами кристаллов жира. В сливочном масле жировые глобулы, остающиеся не поврежденными после взбивания масла, образуют сеть в матриксе свободного жира. Жидкое ядро этих глобул окружено кристаллами жира. Температура размягчения сливочного масла зависит от соотношения жидкой и кристаллической жировой фазы. От различий в физическом состоянии дисперсионной среды сливочного масла и маргарина зависят различия их физических свойств, например, пластичность (способность к намазыванию).

Жировые глобулы в некоторых пищевых продуктах (например, в молоке и молочных продуктах, майонезе, салатных дрессингах, измельченных мясных и рыбных продуктах) существуют в виде дисперсной фазы в водном растворе (рис. 14.4). В свежем молоке жировые глобулы диаметром 0,5–10 мкм отделены друг от друга и от водной среды биомембраной толщиной 10 нм, которая образуется в молочной железе. Поверхность этих мембран покрыта адсорбированными липопротеиновыми частицами. В процессе переработки фракционный состав жировых глобул меняется, что влияет на их способность к агрегации в молоке. Например, в ультрафильтрованном молоке в результате коалесценции капель, обусловленной действием на мебраны силы сдвига, размер жировых глобул больше (1–18 мкм, рис. 14.5). В мороженом и взбитых сливках глобулы жира адсорбируются на поверхности диспергированных пузырьков воздуха (на разделе фаз «вода–воздух»). В свежем сыре глобулы молочного жира окружены белковыми оболочками и распределены в белковой сети (рис. 14.6), а в майонезе плотно упакованные жировые глобулы образуют сотовидную структуру, которая стабилизируется в водной дисперсионной среде фосфолипидами яичного желтка, адсорбированными на поверхности раздела «масло–вода» и, возможно, кристаллами жира на границе раздела [5].

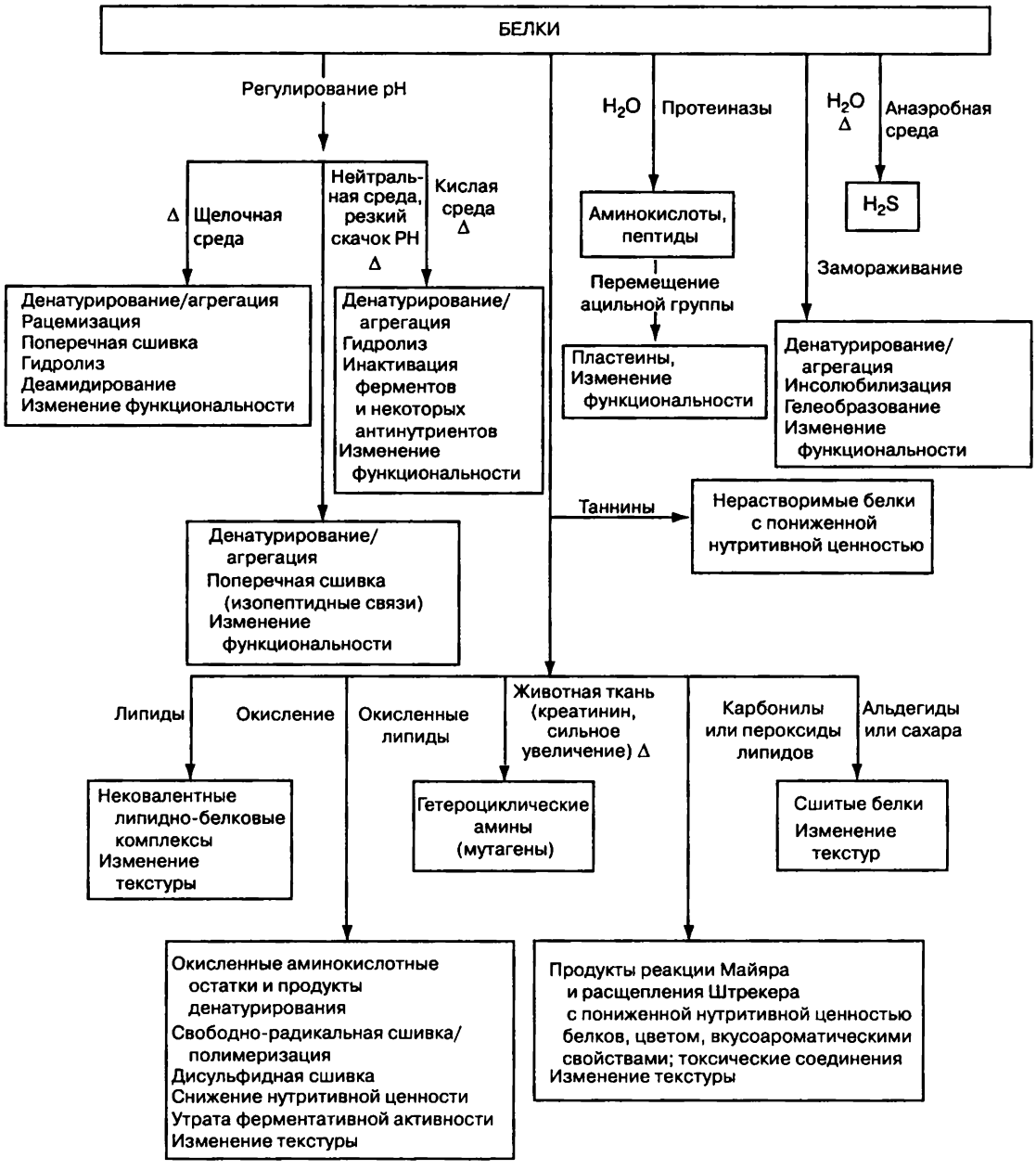


Рис. 14.1. Основные реакции, в которых участвуют белки в процессе производства и хранения пищевых продуктов. По *Food Chemistry* / O. Fennema (ed.) — 3rd ed. — NY: Marcel Dekker, 1996. — P. 1015. (Символ Δ на схеме обозначает здесь увеличение, повышение)

Реологические свойства различных молочных гелей и сыров зависят от размера и количества глобул жира и природы стабилизаторов. Например, низкомолекулярные поверхностно-активные вещества делают поверхность жировых глобул гладкой и не способной к взаимодействию. В результате гели с такими глобулами являются слабыми и высокоплавкими, и, наоборот, гели с жировыми глобулами, стабилизированные сывороточными белками, сильные и низкоплавкие. Это обусловлено образованием поперечных сшивок «белок–белок» между адсорбированными слоями сывороточного белка вокруг жировых глобул.

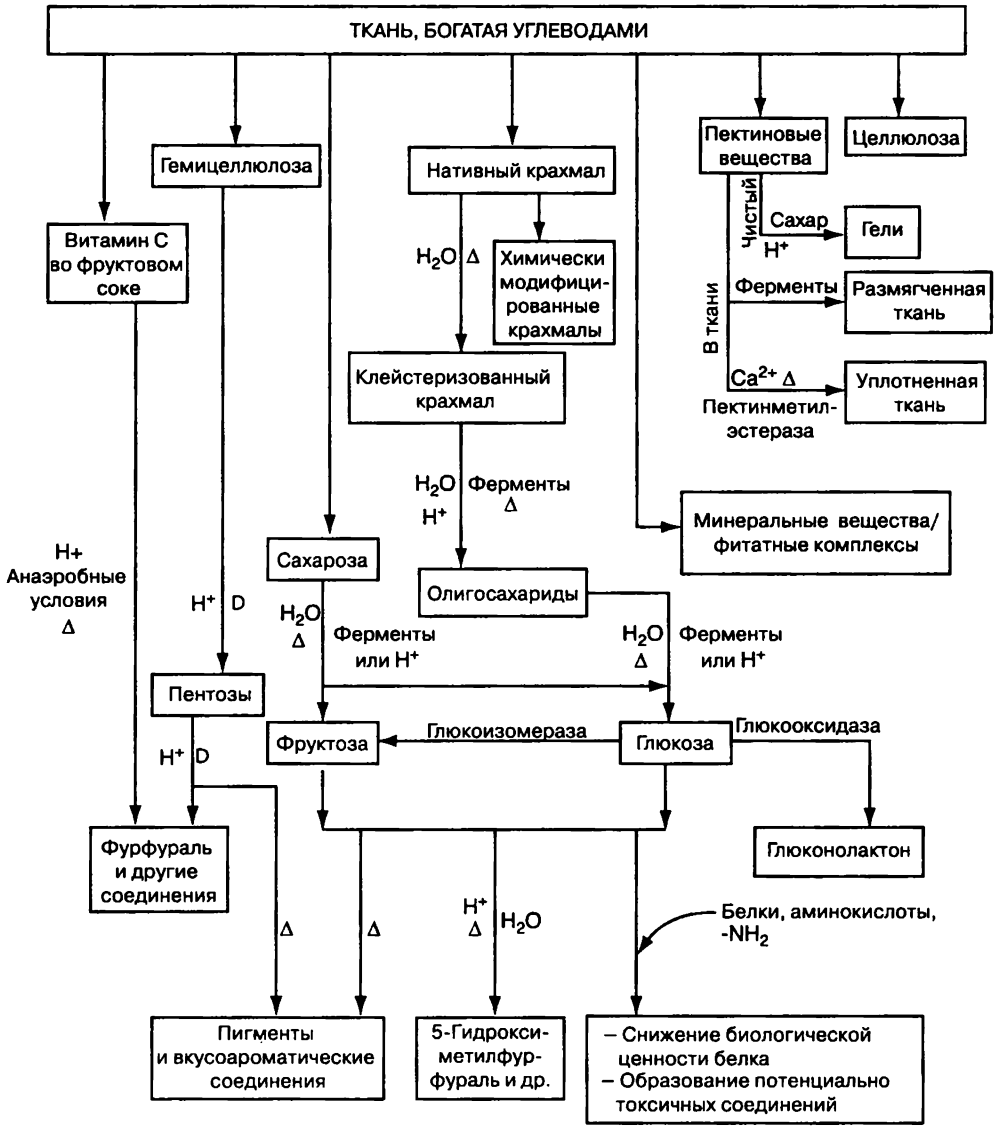


Рис. 14.2. Основные реакции, в которых участвуют углеводы в процессе производства и хранения пищевых продуктов. По *Food Chemistry* / O. Fennema (ed.) — 3rd ed. — NY: Marcel Dekker, 1996. — P. 1016. (Символ Δ на схеме обозначает здесь увеличение, повышение)

Амфифильные жиры образуют в водных средах мицеллы или ламеллярные фазы (см. главу 4). Мицеллы образуются тогда, когда концентрация липидов и температура превышают соответствующие критические значения. В зависимости от свойств липидов встречаются два типа мицелл. У гексагональных мицелл «головы» могут быть полярными, выступающими к поверхности, а углеводородные (полимерные) цепи могут быть ориентированы в осевом направлении к центру цилиндра; кроме того, полярные группы могут иметь осевое направление и образовывать внутри канал для воды, а гидрофобные «хвосты» могут быть ориентированы наружу (инвертированные мицеллы). В зависимости от площади поверхности полярных групп, а также от объема и длины углеводородных цепей мицеллы имеют разную форму. Ламеллярные жидкокристаллические фазы самоорганизуются с укладкой в «стопку» протяженных липидных бислоев, разделенных тонкими слоями воды. В липидах пшеничной муки при гидратации имеет место переход от мицеллярной к ламеллярной фазе [6].

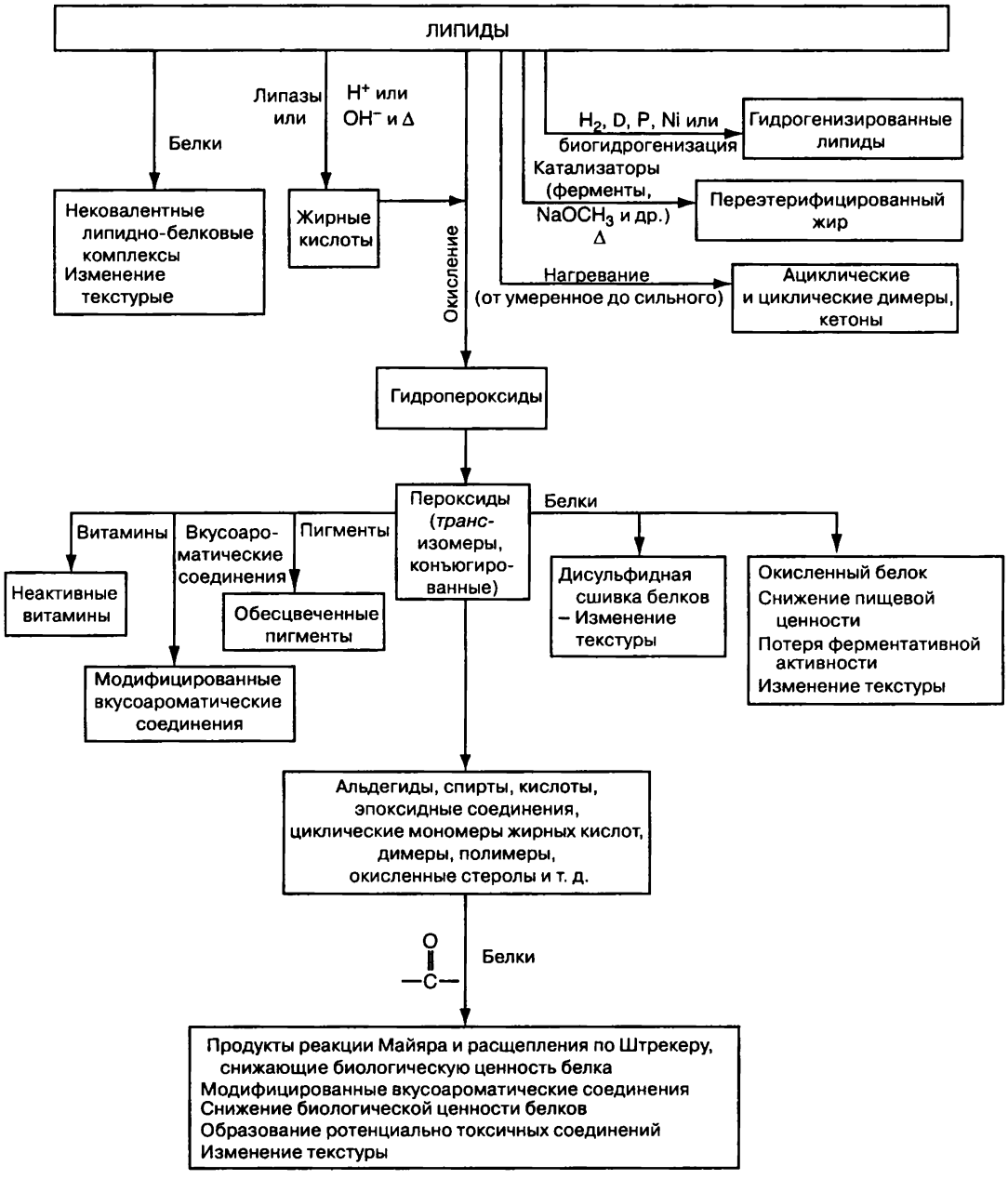


Рис. 14.3. Основные реакции, в которых участвуют липиды в процессе производства и хранения пищевых продуктов. По *Food Chemistry* / O. Fennema (ed.) — 3rd ed. — NY: Marcel Dekker, 1996. — P. 1017. (Символ Δ на схеме обозначает здесь увеличение, повышение)

14.2.2. Белковые фибриллы, листовые структуры и мицеллы

Микроструктура некоторых натуральных и переработанных пищевых продуктов состоит из белковых фибрилл, нитей и слоев. Хорошим примером такой микроструктуры могут служить мясные продукты (см. главу 16). Микроструктура пшеничной клейковины (глютена) состоит из белковых фибрилл или нитей с крахмальными зернами, прилипшими к белковому матриксу (рис. 14.7). Гидратация и набухание частиц крахмала и клейковины в ходе приготовления теста облегчают поперечную сшивку белковых полимеров и, тем самым, образование вязкоупругой сети [7]. Во многих случаях гелеобразная текстура многих пище-

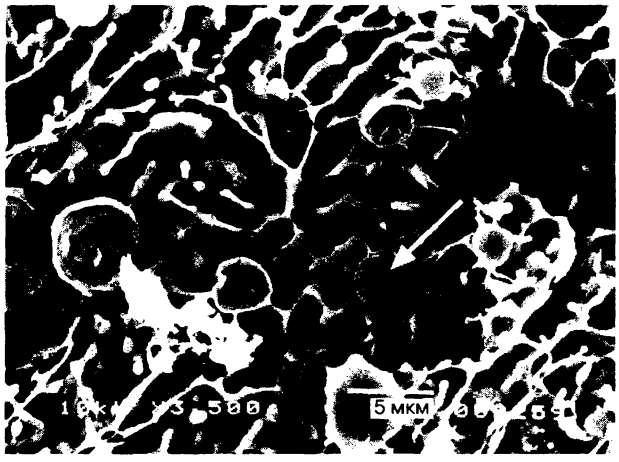


Рис. 14.4. Микрофотография свежего молока, полученная с помощью криогенной сканирующей электронной микроскопии (КриоСЭМ). Глобула жира обозначена стрелкой. По [4] с разрешения издательства *CRC Press*

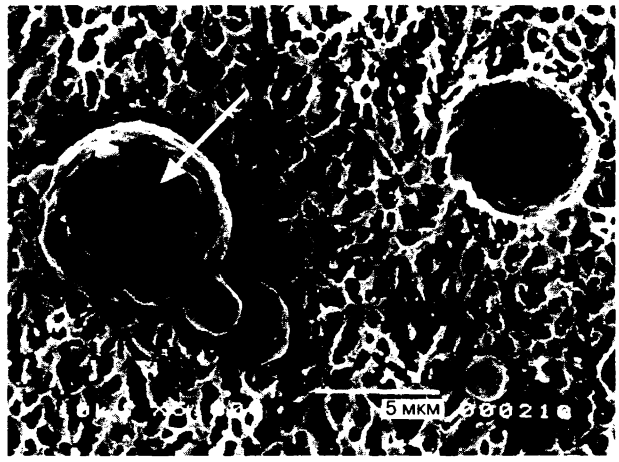


Рис. 14.5. Микрофотография УФ-молока, полученная с помощью криогенной сканирующей электронной микроскопии (КриоСЭМ). Глобула жира обозначена стрелкой. По [4] с разрешения издательства *CRC Press*

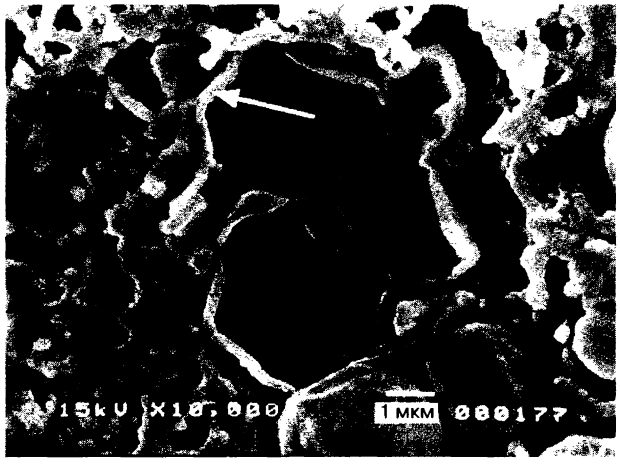


Рис. 14.6. Микрофотография свежего сыра, полученная с помощью криогенной сканирующей электронной микроскопии (КриоСЭМ). Стрелкой обозначена белковая оболочка мембраны глобулы жира. По [4] с разрешения издательства *CRC Press*

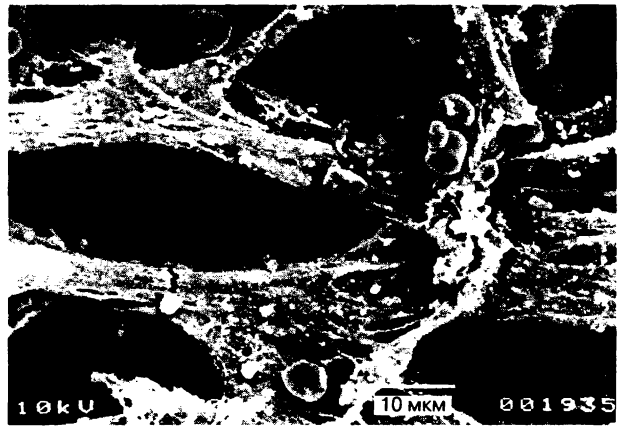


Рис. 14.7. Фибриллы и нити в пшеничной клейковине. Хорошо видны небольшие зерна крахмала, «прилипшие» к белковому матриксу. Фото предоставлено проф. Дж. Форналом

вых продуктов бывает обусловлена взаимодействиями между белками и полисахаридными фибриллами или нитями.

Слоистые листовые структуры, состоящие из некрахмальных полисахаридов типа пектинов, целлюлозы и гемицеллюлозы, образуют губчатую структуру в оболочках семян зерновых злаков, защищающих семена от внешнего негативного воздействия (рис. 14.8). Такая губчатая структура также обусловливает текстуру яблока (рис. 14.9). Полидисперсные белковые мицеллы молока образованы казеинами.

14.2.3. Гранулы и кристаллы

Крахмал присутствует в различном крахмалистом сырье и переработанных продуктах в виде зерен (гранул) сферической, овальной, полигональной, продолговатой и иной формы. Размер гранул крахмала зависит от ботанического происхождения сырья и составляет 0,5–2 мкм в крахмале амаранта, 5–20 мкм —

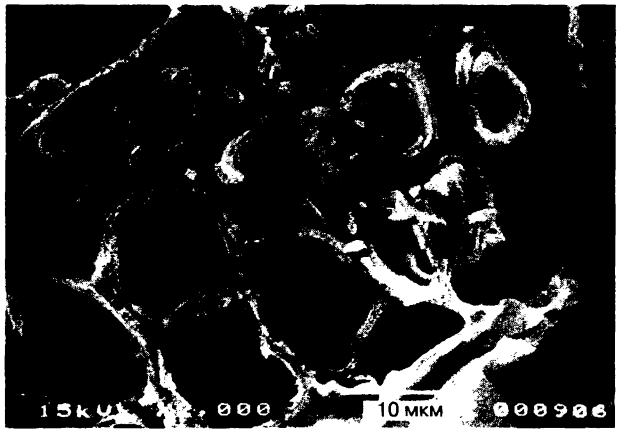


Рис. 14.8. Клетки семенной оболочки ячменя. Фото предоставлено проф. Дж. Форналом

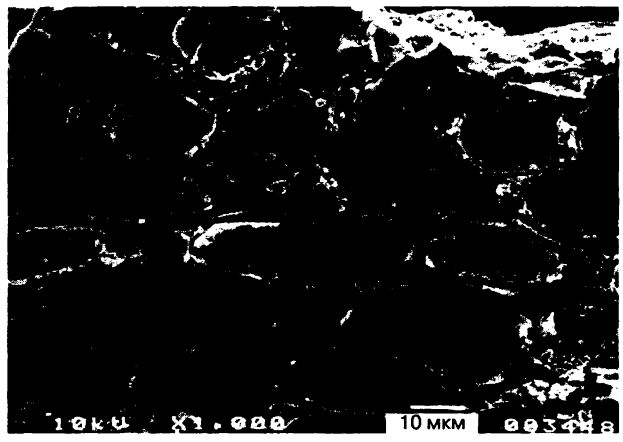


Рис. 14.9. Губчатая структура яблока. Внешний слой (восковые вещества) защищает плод от испарения влаги; ниже расположены крахмальные зерна, являющиеся основными компонентами клеток, и клеточные стенки, «сцементированные» пектиновыми веществами. Фото предоставлено проф. Дж. Форналом

в кукурузном крахмале и 15–75 мкм — в картофельном крахмале (см. главу 3). Гранулы крахмала состоят из амилозы и амилопетина, а также содержат 1–2% липидов, белков и минеральных веществ. Липиды, присутствующие в натуральном крахмале, находятся внутри полисахаридных спиралей и на поверхности в виде включений-комплексов, а также в капиллярах между гранулами крахмала [8]. Во внутренней структуре гранул крахмала чередующиеся кристаллические и аморфные ламели расположены концентрически вокруг ядра крахмального зерна. В присутствии воды микроструктура зерен меняется (рис. 14.10). Первоначально при относительно низком содержании влаги слой аморфной амилозы из внутренней части смещается к поверхности гранул вследствие ее набухания, и на поверхности в результате активности ферментов появляются небольшие поры. При содержании влаги более 30% и при достаточно высокой температуре происходит клейстеризация крахмала [9].

Частицы крахмала с однородным распределением размеров (1–2 мкм) действуют как имитаторы жира, придавая пищевому продукту способность к намазыванию и жироподобность. В большей степени это относится к пищевым гелям из растительного сырья с высоким содержанием крахмала. Этим свойством обладают и частицы пектината кальция размером около 40 мкм.

В зависимости от фракционного состава свой вклад в текстурные свойства многих сливко- и гелеподобных пищевых продуктов вносят и белковые частицы. В этом отношении более предпочтительны яичный и молочные белки из-за их способности образовывать при соответствующих условиях обработки агрегированные частицы. Размеры этих частиц существенно влияют на реологические свойства материала — очень мелкие частицы (например, казеиновые мицеллы размером около 0,1 мкм) придают гелеподобные свойства и способность к намазыванию, частицы размером около 2 мкм — густую сливочную текстуру, а крупные частицы (размером более 50 мкм) — ощущение песчанистости и зернистости [4].

Почти во всех семенах содержатся гранулы белка, известные как белковые тела или алейроновые зерна. Эти гранулы, обычно сферические, в зависимости от вида и сорта злаковой или бобовой культуры различаются по размеру. Их средний размер у кукурузы составляет около 2 мкм, у сорго — 0,5–3 мкм, у кормовых бобов — 1–5 мкм, у арахиса — 2–10 мкм, у сои — 2–20 мкм. Белковые тела в соевых бобах расположены внутри губчатой цитоплазматической белковой сети (рис. 14.11) [10].

Кристаллы жира присутствуют в различных молочных продуктах, шоколаде и шортенингах (рис. 14.12). Триацилглицерины (ТАГ) существуют в нескольких кристаллических формах, основными из которых являются α, β′и β (см. главу 4) с разными стабильностью и температурами плавления. Наиболее стабильны в β-форме ТАГ с одной и той же жирной кислотой во всех трех позициях. ТАГ с разными жирными кислотами кристаллизуются в виде β′- или β-кристаллов. ТАГ хлопкового, пальмового, рапсового и селедочного

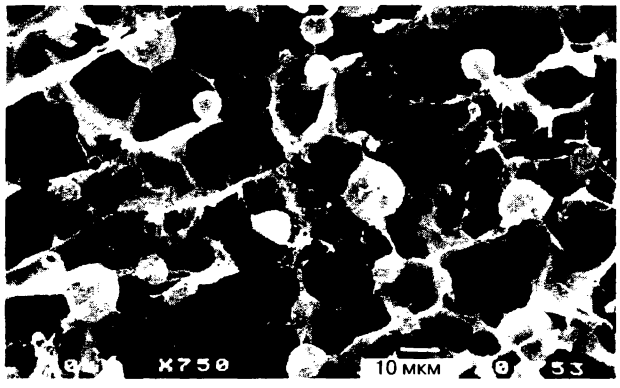


Рис. 14.10. Микроструктура крахмального (8%) клейстера из тапиоки, заваренного в течение 15 мин при 64 °С. Заметна клейстеризация гранул крахмала — гидратированные гранулы образуют сеть с растворенной амилозой, вытекшей из набухших гранул. Фото предоставлено д-ром Виолеттой Блащак

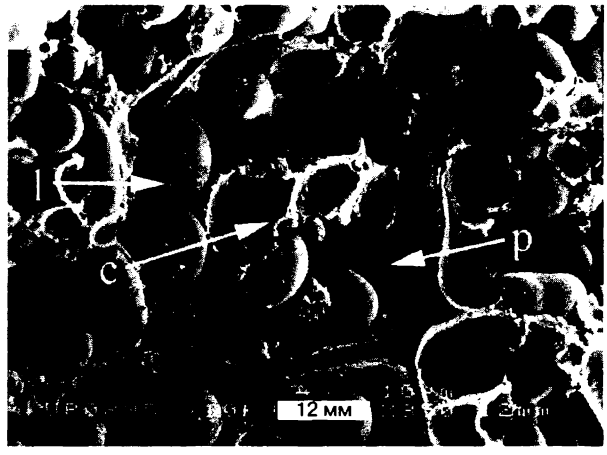


Рис. 14.11. Микрофотография клеток семядоли соевого боба: p — белковые тела, l — липидные тела, c — цитоплазматическая сеть. По [4] с разрешения издательства *CRC Press*



Рис. 14.12. Кристаллы жира в спреде. Фото предоставлено проф. Дж. Форналом

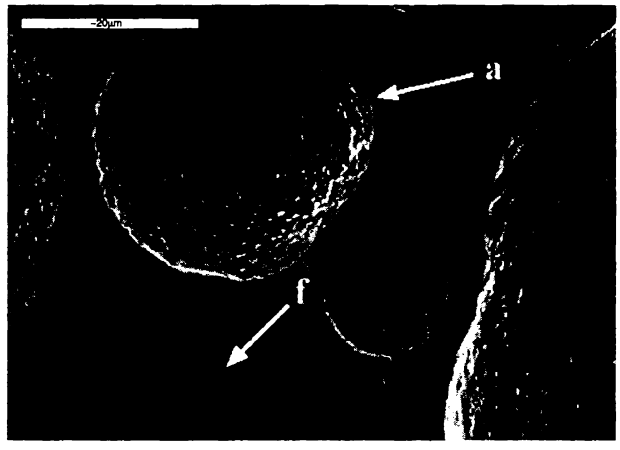


Рис. 14.13. КриоСЭМ-микрофотография мороженого: a — пузырек воздуха; f — жировая глобула на поверхности раздела. По [4] с разрешения издательства CRC Press

масел, а также в молочном и твердом животном жире принимают преимущественно β′-форму, тогда как ТАГ соевого, подсолнечного, арахисового, оливкового, кукурузного, кокосового, канолового масел, масла какао и лярда склонны образовывать стабильные β-кристаллы. В маргарине и шортенингах желательны β'-кристаллы, которые имеют игольчатую форму и длину около 1 мкм, но могут также появляться в виде плоских бляшек. В таких структурах может содержаться большое количество мелких пузырьков воздуха, придающих изделиям пластичность и кремообразность. Считается, что за образование нежелательного поседения шоколада отвечают трансформации полиморфных форм масла какао, а за песчанистую текстуру некоторых пищевых продуктов — крупные сферолиты со случайным расположением кристаллов.

Типичным компонентом, образующим структуру мороженого (рис. 14.13), взбитых сливок, хлеба и пивной пены являются воздушные пузырьки. Пузырьки газа могут быть диспергированы в твердом матриксе (например, в хлебе или торте) или в жидкости (например, во взбитых сливках, где они стабилизируются белковой пленкой). Фракционный состав и стабильность этих диспергированных пузырьков воздуха играет ключевую роль в формировании органолептических свойств этих продуктов (особенно текстуры).

14.3. Химические взаимодействия компонентов пищевых продуктов

14.3.1. Введение

К химическим взаимодействиям компонентов пищевых продуктов в условиях производства и хранения относятся в основном реакции Майяра, карамелизация сахаров, другие пиролитические изменения, взаимодействия хинонов с аминами и аминокислотами, различные процессы окисления, а также реакции белков в щелочных средах. Результаты этих взаимодействий могут быть как желаемыми для качества пищевых продуктов, (например, потемнение корочки хлеба, зерен кофе или кусочков лука при обжаривании), так и нежелательными (например, изменения цвета сгущеного молока или сушеных растений). В ходе многих реакций образуются вкусоароматические вещества, которые также в зависимости от продукта могут быть желаемыми или нежелательными. Пищевая ценность и безопасность пищевых продуктов для здоровья вследствие потери ценных компонентов или образования некоторых мутагенных и канцерогенных соединений могут ухудшаться, однако преимущества сенсорного (органолептического) качества зачастую значительно важнее, чем некоторая потеря биологической ценности.

14.3.2. Реакция Майяра

14.3.2.1. Вещества и субстраты, участвующие в реакции

Реакции Майяра иногда называют реакциями неферментативного потемнения, поскольку конечными продуктами этих реакций являются меланоидины коричневого цвета. Неферментативное потемнение вызывается также карамелизацией сахаров, взаимодействиями хинонов с аминами и аминокислотами или взаимодействиями окисленных липидов с белком. Неферментативное потемнение легко отличить от ферментативного, обусловленного ферментативным окислением полифенолов пищевых продуктов.

К наиболее важным углеводам, участвующим в реакциях Майяра, относятся глюкоза и фруктоза, но в мясе это может быть рибоза. Важным предшественником потемнения в молочных продуктах является дисахарид лактоза, а в зерновых продуктах — мальтоза (например, в солоде). Сахароза легко расщепляется до глюкозы и фруктозы, особенно при нагревании, и поэтому она легко участвует в неферментативном потемнении. Связанные сахара (например, гликозиды в гликопротеинах, гликолипидах и в гетерогликозидах) менее реакционноспособны, однако при нагревании с образованием свободных редуцирующих сахаров могут высвобождаться агликоны.

К другим участниками реакции Майяра относятся белки, пептиды, аминокислоты и другие аминные соединения. Основная реакционноспособная группа белков — это ε-аминогруппа остатка лизина. Участвовать в реакции могут также концевые аминогруппы пептидных цепей, но их концентрация в белках в несколько раз ниже, чем лизина. В неферментативном потемнении могут также участвовать гуанидиновая группа аргинина или тиольная группа цистеина. В некоторых пищевых продуктах (особенно в сырах и рыбе) предшественниками продуктов реакции Майяра являются также биогенные амины. Реакционноспособными являются гидроксид аммония и соли аммония, а также амины.

Кроме того, в реакции потемнения участвуют альдегиды и другие карбонильные соединения, которые образуются из производных сахаров (например, аскорбиновая кислота), а также из других предшественников, преимущественно из окисленных липидов.

14.3.2.2. Механизм и продукты реакции Майяра

Реакция Майяра протекает в три стадии:

1. Реакция амина с редуцирующим сахаром, сопровождаемая перегруппировкой по Амадори с образованием глюкозиламина (рис. 14.14).

2. Дегидратация промежуточных продуктов, фрагментация сахаридной части и расщепление по Штрекеру (рис. 14.15).

3. Реакции промежуточных продуктов с образованием гетероциклических вкусоароматических соединений, то есть высокомолекулярных коричневых пигментов, обусловливающих типичный вкус и аромат жареных продуктов (рис. 14.16).

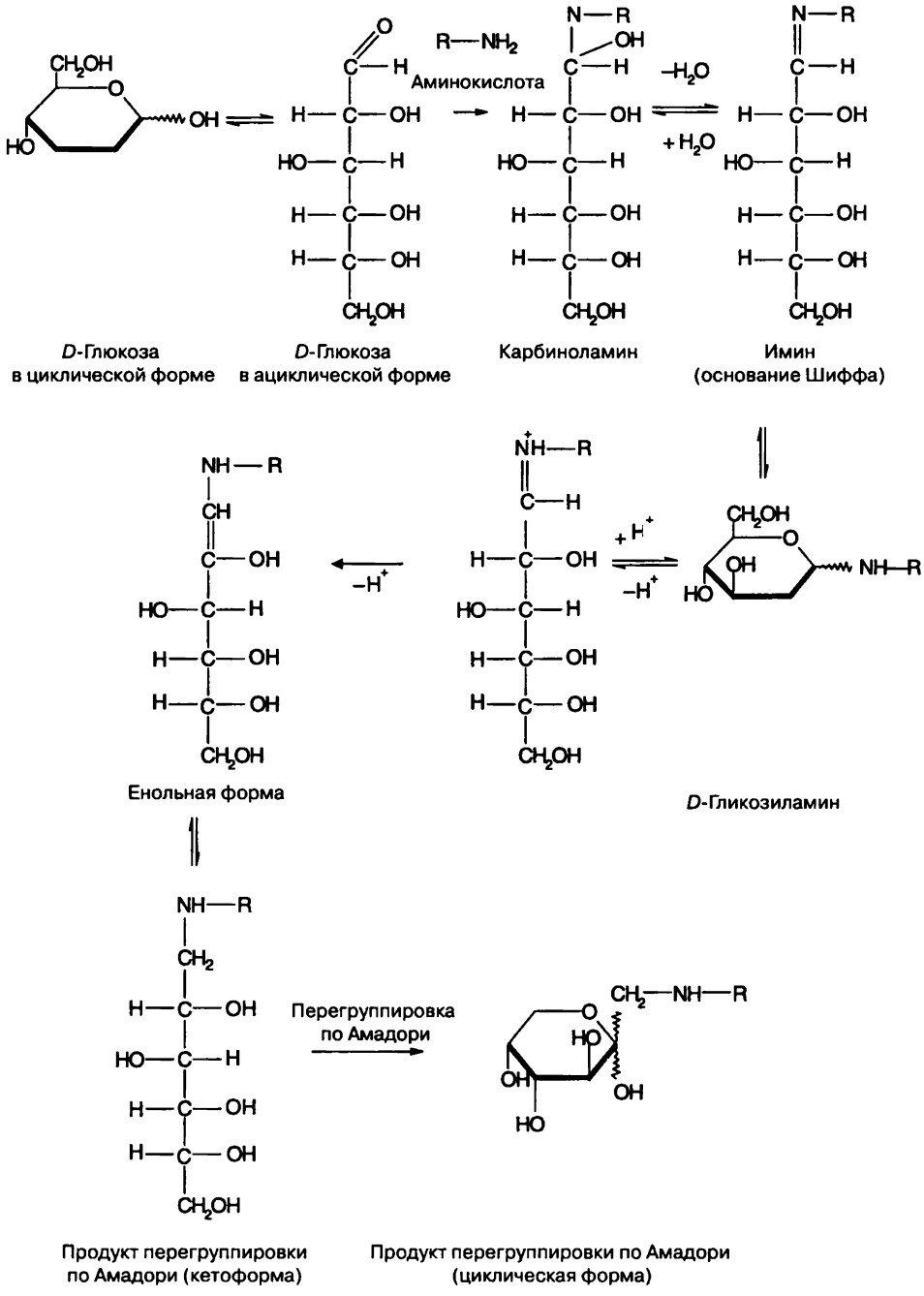


Рис. 14.14. Образование глюкозиламина и перегруппировка по Амадори

Реакция Майяра начинается с присоединения непротонированной аминогруппы к электрофильному атому углерода карбонильной группы редуцирующего сахара (рис. 14.14). Продукт, получаемый в результате такого присоединения, монотропный карбониламин или подобное ему соединение, дегидратируется с образованием имина или основания Шиффа (или азометина). Скорость присоединения с увеличением электронной плотности нуклеофильного амина возрастает, при этом важно индуктивное влияние заместителей в карбонильной группе и стерических факторов.

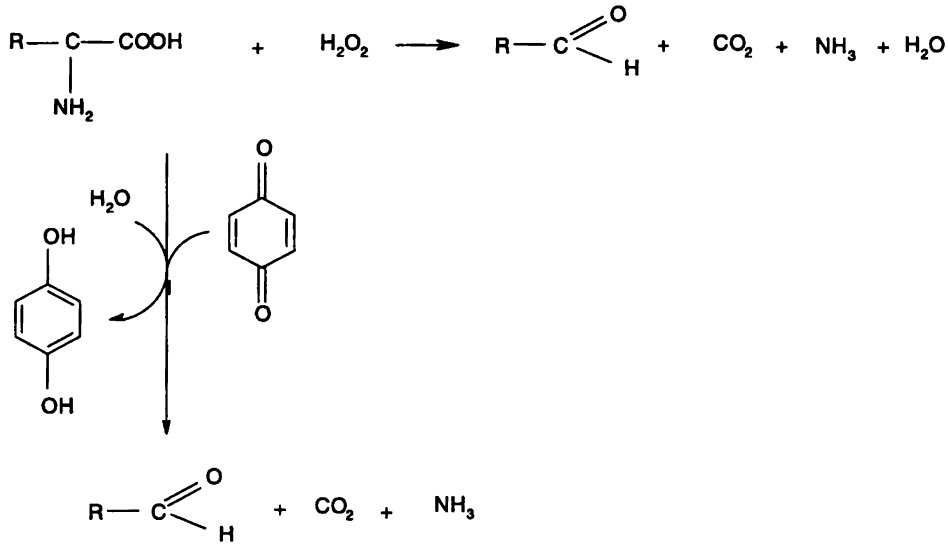


Рис. 14.15. Окислительное расщепление аминокислот (расщепление по Штрекеру)

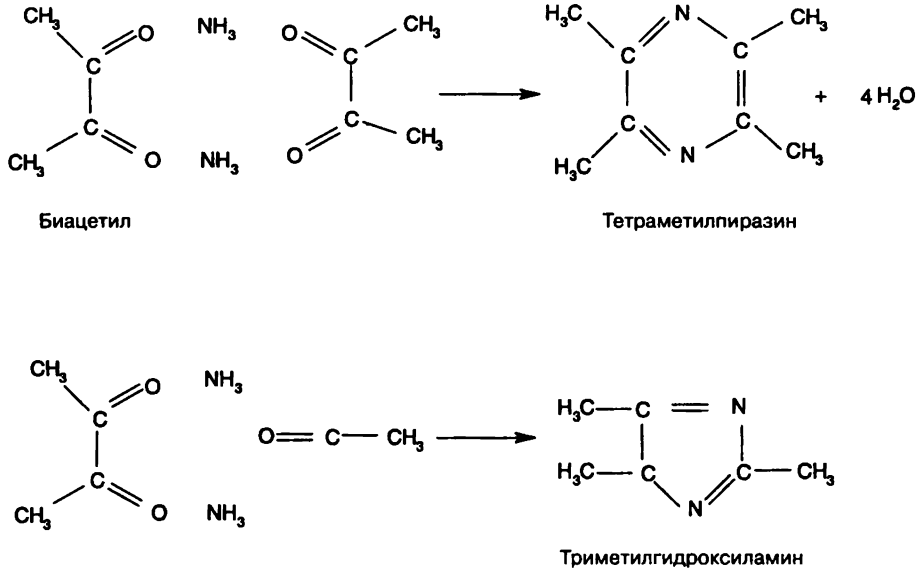


Рис. 14.16. Образование гетероциклических вкусоароматических соединений

Реакционная способность карбонильной группы при реакциях с аминокислотами снижается в следующей последовательности:

альдозы более реакционноспособны, чем кетозы;

- триозы вступают в реакцию быстрее, чем тетрозы, тетрозы быстрее, чем пентозы, которые более реакционноспособны, чем гексозы и дисахариды;

α-дикарбонильные производные реагируют с аминокислотами легче, чем альдегиды, которые более реакционноспособны, чем кетоны, редуцирующие сахара еще менее реакционноспособны, а за ними следуют оксокислоты;

- сахара в алифатической форме реагируют легче, чем в циклической форме.

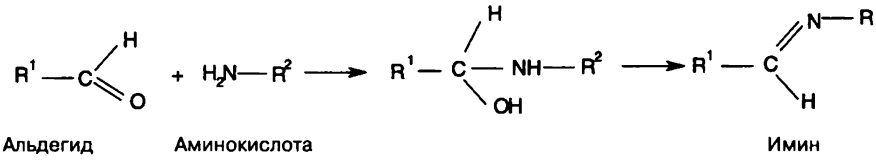


Рис. 14.17. Реакция карбонильных соединений с аминогруппами

Реакционная способность аминосоединений зависит от их основных свойств: гидроксид аммония и ионы аммония реагируют с редуцирующими сахарами легче, чем амины, у которых реакционная способность снижается с уменьшением их щелочных свойств.

Протонирование карбонильной группы увеличивает ее способность реагировать с нуклеофильными веществами, тогда как протонирование аминогруппы снижает реакционную способность. Механизм взаимодействия карбонильной и аминогрупп показаны на рис. 14.17. Со снижением значения pH концентрация протонированных карбонильных групп возрастает, а концентрация непротонированных аминогрупп снижается, и в результате скорость реакции с аминами достигает максимума в слабокислой среде, а скорость реакции с аминокислотами — в слабощелочной.

Нестабильное основание Шиффа стабилизируется последующими реакциями (в частности, обратимой реакцией между карбонильной и аминогруппой). Гликозиламины в водных растворах существуют в формах соответствующих пираноз или фураноз, аналогичных исходным сахарам. Они также легко подвергаются мутаротации или гидролизуются в первоначальные сахара и амин.

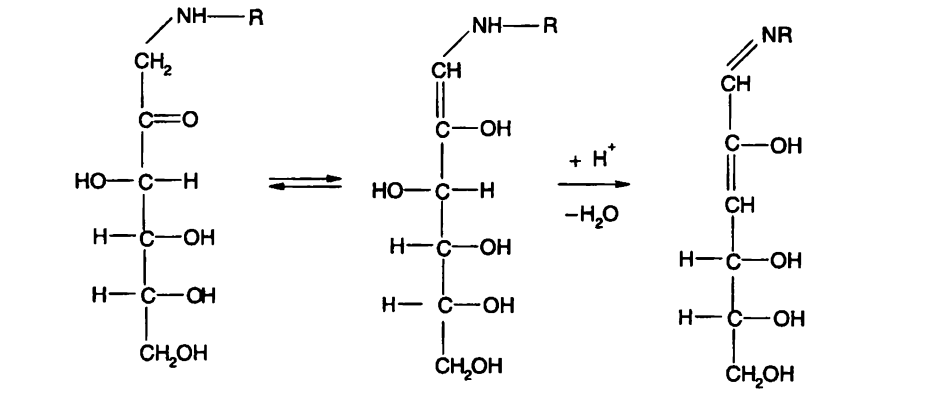
В ходе последующей перегруппировки по Амадори *N*-альдозиламины преобразуются в кетозамины или 1-амино-1-дезоксикетоны (эта стадия реакции не обратима). *N*-кетозамины преобразуются в ходе перегруппировки по Хейнсу по сходному механизму в альдозамины или 2-амино-2-дезоксиальдозы. Обе эти реакции катализируются кислотой. Альдозамины, встречающиеся в форме фураноз, почти в десять раз реакционноспособнее, чем соответствующие пиранозы. Участвующая в реакции аминокислота одновременно выполняет функцию катализатора, так как ее карбоксильная группа может служить донором протона. Катализировать эту реакцию могут также другие карбоновые кислоты и фосфаты.

Альдозиламины, полученные из аминокислот и других первичных аминов, могут реагировать с другой молекулой альдозы с образованием диальдозиламинов. Они перегруппируются в дикетозамины аналогично перегруппировке по Амадори.

При реакции ретроальдолизации гликозиламинов образуются высоко реакционноспособные дикарбоновые промежуточные продукты (в частности, N-алкилимин гликоальдегида и *D*-эритроза). Алкилимины сразу димеризуются в *N,N'*-диалкилдигидропиразины, легко окисляемые в соли пиридиния. Имины также гидролизуются с образованием гликольальдегида, окисляющегося в глиоксаль. Последний образуется также при ретроальдолизации гексоз-2-улоз. Аминокислоты, содержащие серу и ароматические группы, преобразуются в различные гетероциклические соединения: например, *D*-глюкоза реагирует с цистеином с образованием 2-(*D*-глюко-1,2,3,4,5-пентагидроксипентил)-тиазолидин-4-карбоновой кислоты.

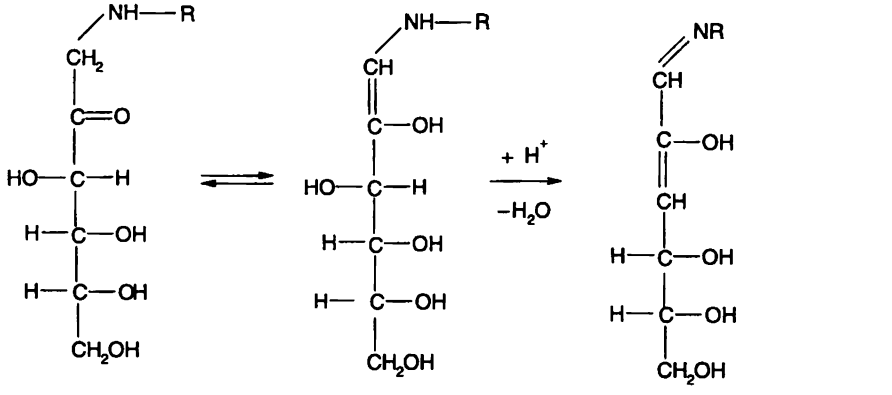
Все аминодеоксисахара (рис. 14.18) являются сильными восстановителями, более реакционноспособными, чем исходные сахара. Они мутаротируют в водных растворах с образованием равновесной смеси отдельных пространственных форм. Кетозамины (продукты перегруппировки по Амадори) в твердом состоянии или в нейтральных водных растворах относительно стабильны, однако их стабильность существенно ниже, чем стабильность исходного сахара в кислотных и щелочных средах. Если соединение существует в фуранозной или алифатической форме, то распад протекает быстрее. В равновесных смесях всегда содержится небольшое количество алифатической формы. Альдозамины (продукты перегруппировки по Хейнсу) расщепляются аналогично кетозаминам.

Расщепление кетозаминов начинается с 1,2-енолизации с образованием аминового аналога 1-ен-1,2-диола или 1-ен-1-амин-2-ола (см. рис. 14.18). Расщепление производной амина 1-амино-2-деокси-гексоз-2-улозы приводит к образованию 3-деокси-*D*-эритро-гексо-2,3-диулозы, которая затем в результате дегидратации превращается в 3,4-дидеокси-*D*-глицеро-гекс-3-ен-2-улозу, 5-гидроксиметилфуран-2-карбальдегид и другие соединения.



D-Фруктозамин (продукт перегруппировки по Амадори) 2-Енаминол 3-Деокси-*D*-эритро-гексоз-2-улоза

Рис. 14.18. 1,2-Енолизация продукта перегруппировки по Амадори



D-Фруктозамин (продукт перегруппировки по Амадори) 3-Енедиол 1-Деокси-*D*-эритро-2,3-гексо-2,3-диулоза

Рис. 14.19. 2,3-Енолизация продукта перегруппировки по Амадори

Еще одной реакцией является 2,3-енолизация с образованием 2-ен-2,3-диола, который затем распадается до 1-деокси-D-эритро-гексо-2,3-диулозу (рис. 14.19). Эти продукты аналогичны образующимся во время разложения сахаров в отсутствие производных аминов, то есть в ходе их карамелизации, однако аминокислоты и другие производные аминов катализируют разложение сахаров. Эта реакция легко протекает при комнатной температуре и в типичной для пищевых продуктов слабокислой среде (pH 4–7). Несмотря на то что 3- и 4-деокси-производные в основном образуются в отсутствие аминосоединений, характерными продуктами, образующимися в присутствии последних, являются 1-деокси-производные. При более высоких температурах преобладает 1,2- и 2,3-дегидратация кетозаминов.

В присутствии кислорода кетозамины расщепляются на соответствующие глико-2-гексосулозы. Эта реакция катализируется переходными тяжелыми металлами. Основными продуктами распада 3-деокси-*D*-эритро-гексоз-2,3-улоз являются (*Z*)-3,4-дидеокси-*D*-глицеро-гекс-3-ен-2-улоза, соответствующий (*E*)-изомер и 5-гидроксиметилфуран-2-карбальдегид (см. рис. 14.19). Производные фурана и пиррола образуются в случае избытка аминовых производных (рис. 14.20). В присутствии аминокислот образуются 1-карбоксиметил-замещенные пиррол-2-карбальдегиды. Связанный с белком лизин реагирует

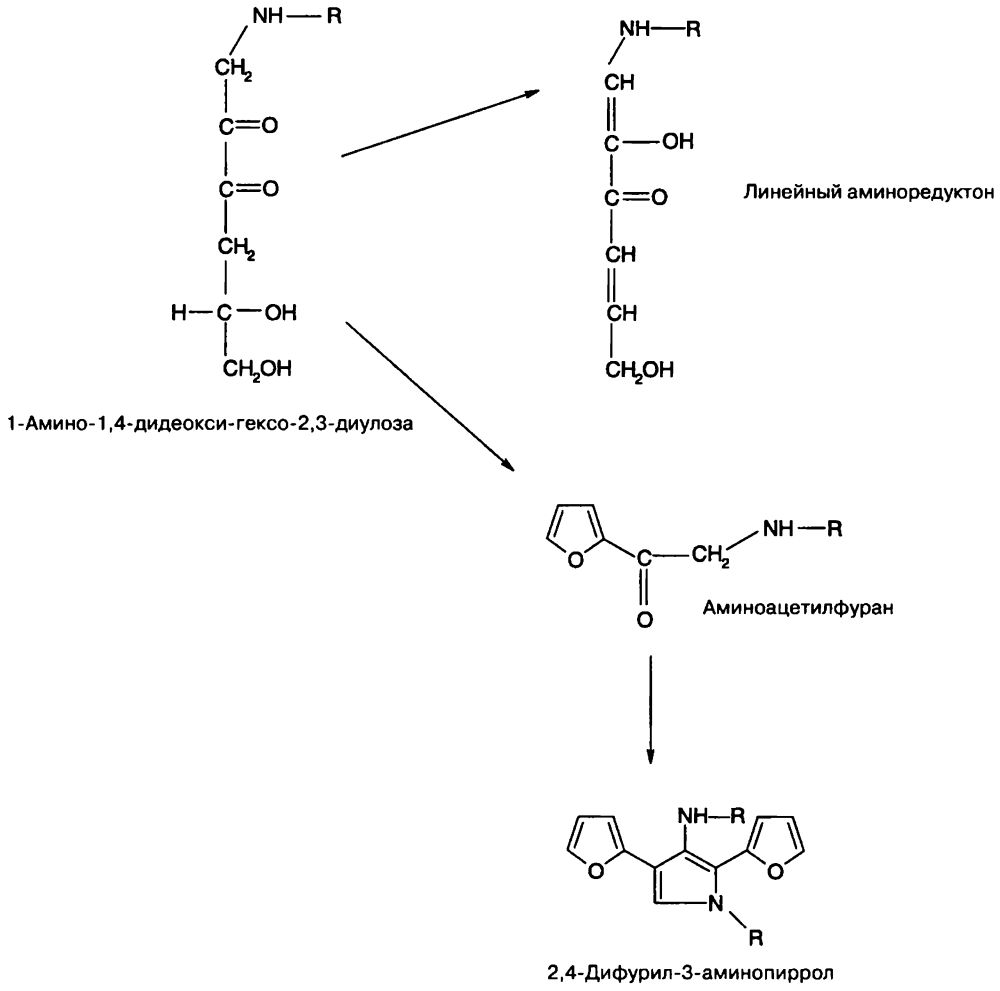


Рис. 14.20. Расщепление 1-амино-1,4-дидеокси-2,3-диулоз до аминоредуктонов

с 3-деокси-*D*-эритро-гексоз-2-улозой с образованием производных пиррола. Аналогичные соединения образуются и при реакциях с дисахаридами.

Полигидроксиалкил-замещенные пирролы образуются в результате реакции 3-деоксигексоз-2-улоз с кетозаминами. В присутствии аммиака аналогичные пиразины могут образоваться путем димеризации кетозаминов. Все полигидроксиалкилзамещенные гетероциклические соединения при нагревании могут превращаться в соответствующие алкилзамещенные производные.

Другие продукты реакции Майяра (1-деоксиглико-2,3-диулозы) также являются высоко реакционноспособными соединениями. Они не были выделены непосредственно из пищевых продуктов, но из последних были выделены продукты их разложения — фураноны. В присутствии цистеина образуются различные серосодержащие производные, обусловливающие вкус и аромат вареного или жареного мяса.

Аминоредуктоны образуются в результате разложения 1-дидеокси-2,3-диулоз. Они легко превращаются в 1-амино-1,4-дидеокси-гексо-2,3-диулозы, изомеризуемые в соответствующие линейные аминоредуктоны (см. рис. 14.20). Эта реакция обратима, но смещается к образованию аминоредуктона. Параллельный продукт этого превращения, аминоацетилфуран, димеризуется в 2,4-дифурил-3-аминопиррол. Еще од-

ним продуктом расщепления 1-деоксигексозонов является высоко соединение с высокой реакционной способностью — диацетилформозин [2,4-дигидрокси-2,5-диметил-(2H)-фуран-3-он], который реагирует с первичными аминами с образованием замещенных пирролидонов, а также со вторичными аминами с образованием алициклического аминоредуктона. Аналогичная метиленредуктоновая кислота образуется при реакции дезоксиозонов с первичными аминами, а аналогичная редуктоновая кислота — при взаимодействии аминокислот с пентозами.

Реакция Штрекера является очень важным видом взаимодействия между продуктами расщепления сахаров и аминокислотами. Реакционноспособными производными сахаров являются α-дикарбонильные соединения (глико-2-улоза или глико-2,3-диулоза), а также другие простые соединения, образующиеся при разложении сахаров (например, глиоксаль или метилглиоксаль). Расщепление аминокислот по Штрекеру приводит к образованию альдегидов, аммиака и диоксида углерода. Каждая аминокислота продуцирует определенный альдегид с характерным запахом (см. главу 5), который затем вступает в реакцию с производными аминов с образованием вкусоароматических соединений, типичных для пищевых продуктов, подвергнутых тепловой обработке.

14.3.2.3. Влияние условий реакции

Как на скорость, так и на механизм реакции Майяра влияет температура. Энергия активации варьирует от 10 до 160 кДж/моль. На энергию активации большое влияние оказывает содержание влаги. Скорость потемнения с ростом температуры увеличивается и достигает максимума при активности воды 0,3–0,7. При низком содержании влаги реакция Майяра протекает медленно, и ее скорость с увеличением концентрации воды возрастает, однако при очень высоком содержании влаги скорость реакции начинает снова падать из-за снижения концентрации реагентов. С увеличением значения pH скорость реакции Майяра возрастает, достигая максимума в слабощелочной среде. Неферментативное потемнение ингибируется диоксидом серы и сульфитами, а также другими серосодержащими соединениями, поскольку они реагируют с альдегидом и кето-группой или сахарами, снижая их реакционную способность.

14.3.2.4. Влияние на биологическую ценность

Продукты ранней стадии реакции Майяра, в том числе остаток лизина, могут усваиваться организмом человека, однако дальнейшие превращения постепенно делают эту аминокислоту недоступной. Обычно изменения лизина характерны в основном для внешних поверхностей продуктов, традиционно подвергаемых воздействию высоких температур при выпечке, обжаривании или в ходе приготовления на гриле, тогда как в центральной части буханки хлеба или приготовленного мяса концентрация продуктов реакции невелика. Тем не менее, в различных промышленно выпускаемых жидких и порошковых белковых продуктах для энтерального питания биодоступность лизина может снижаться до 25% [11]. Такие продукты обычно производят на основе белков с высокой биологической ценностью, богатых лизином, причем углеводные компоненты могут содержать значительные количества редуцирующих сахаров. Это же справедливо и для смесей, применяемых в питании детей. В некоторых продуктах, богатых белками и редуцирующими сахарами (например, в сгущеном молоке), реакции неферментативного потемнения протекают при комнатной температуре. Хотя скорость реакции в таких условиях значительно ниже, после нескольких месяцев хранения содержание биодоступного лизина может снижаться на несколько процентов. Потери усвояемого лизина могут быть проанализированы путем определения содержания неизменившегося аминокислотного остатка или некоторых продуктов ранней стадии реакции Майяра — фурозина или *N*ε-карбоксиметиллизина.

Высказано предположение, что при взаимодействии глюкозы с аспарагином, протекающем по типу реакции Майяра, может образовываться акриламид. В жареном и печеном картофеле концентрация акриламида возрастает по мере увеличения содержания фруктозы и глюкозы в сырье. Смывание редуцирующих сахаров и аспарагина с поверхности ломтиков картофеля перед обжаркой может значительно снизить содержание акриламида в готовых жареных продуктах [12]. Акриламид легко взаимодействует с тиольной группой цистеина и медленнее — с амино- и гидроксильными группами разных компонентов, что обеспечивает химический механизм снижения накопления акриламида в пищевых продуктах.

14.4. Реакции, протекающие при нагревании в щелочных условиях

В пищевых системах в результате щелочной обработки происходят другие типы взаимодействий между компонентами. Щелочи применяют в производстве пищевых продуктов для экстрагирования и текстурирования белков из различного сырья (например, из семян масличных растений, зерна, костей или туш животных), для инактивации микотоксинов и белковых ингибиторов, для выделения нуклеиновых кислот из одноклеточной биомассы, для снятия кожуры фруктов и овощей, а также при приготовлении тортилий. Первой стадией реакций белков, нагреваемых в щелочных условиях, является β-элиминирование в остатках цистеина, серина, фосфосерина и треонина под воздействием гидроксид-иона (см. главу 5). Реакции нуклеофильного присоединения к двойной связи остатка дегидроаланина, протекающие в результате β-элиминирования, приводят к поперечной сшивке полипептидных цепей и образованию различных неприродных соединений. Среди продуктов гидролиза белков, нагреваемых при высоких значениях pH, наряду с другими аминокислотами, появляются смесь *L*-лизино-*L*-аланина и *L*-лизино-*D*-аланина (возможно, с небольшой долей *DL*- и *DD*-изомеров, орнитиноаланина, лантионина и метиллантионина). Продуктами реакции с аммиаком и с фенилэтиламином являются соответственно диаминопропионовая кислота и 3-(N-фенилэтиламино)-аланин. Рекомбинация карбоаниона с протоном приводит к образованию *L*- и *D*-энантиомеров аминокислот (см. главу 5). Продолжительное нагревание в щелочных условиях может снизить биологическую ценность белков вследствие потери эссенциальных аминокислот и рацемизации, учитывая, что *D*-формы всасываются медленнее, чем *L*-формы. *D*-энантиомеры для синтеза белков не используются. Лизиноаланин образует хелатные комплексы с Cu^{2+}, Co^{2+} и Zn^{2+}, тем самым инактивируя металлоферменты и вызывая у крыс нефроцитомегалию [13, 14]. Известно, что при нагревании белков в щелочных средах образуются и другие продукты, приводящие к нарушениям работы почек, например, диаминопропионовая кислота и *D*-серин.

Положительным эффектом нагревания при высоких значениях pH является высвобождение ниацина (витамина PP). Традиционный для индейцев племени Хопи способ кипячения зрелых зерен кукурузы со щелочной древесной золой приводит к гидролизу эфирных связей, связывающих ниацин с сахарами, и превращению неусвояемого полимера в свободный (биодоступный) ниацин [15].

14.5. Взаимодействия «вода–белок» и «белок–белок»

14.5.1. Вода в белковых структурах

На структурные характеристики белков в пищевых продуктах с высоким содержанием влаги влияют их взаимодействия с водой за счет образования водородных и гидрофобных связей. Таким образом, взаимодействия «вода–белок» влияют на стабильность белковых молекул и комплексов (в частности, казеиновых мицелл), а также на функциональные свойства белков пищевого сырья и продуктов.

Вода составляет около 60–85% массы мышечных тканей говядины, свинины, птицы, рыбы, моллюсков и ракообразных, тогда как белок — лишь 12–22%. Такое большое количество влаги может удерживаться в мясе при воздействии силы тяжести, центробежных сил или механического сжатия в основном благодаря ее компартментализации в тканях и различным взаимодействиям с белковыми молекулами. Это свойство мышечных тканей, известное как влагоудерживающая или влагосвязывающая способность, может быть оценена либо измерением объема жидкости, выделенной из образца мяса, либо добавлением воды или водного раствора к измельченной ткани с последующим определением количества влаги, удерживаемой осаждаемым материалом в центрифужной пробирке. Любые технологические или биохимические воздействия, ослабляющие миофибриллярную структуру вследствие усиления взаимного отталкивания между фибриллами, нитями и слоями, повышают влагоудерживающую способность. На удержание воды в пищевых системах на основе мяса и, соответственно, на сочность продуктов влияют многие факторы, включая характеристики белков, значение pH, концентрацию метаболитов послеубойного периода и добавление солей (в основном органических и неорганических фосфатов), а также изменения белков вследствие тендеризации мяса, его хранения в замороженном виде и переработки. От взаимодействий «вода–белок» зависят также некоторые другие функциональные свойства, в частности гелеобразующая и эмульгирующая способность, вспенивание, вязкость и загустевание (см. о них главу 5).

14.5.2. Ингибирование роста кристаллов льда

Некоторые белки взаимодействуют с молекулами воды в кристаллах льда. Такие взаимодействия дают возможность рыбам, обитающим в полярных морях, пережить зиму в морской среде. В крови этих рыб, как и в крови некоторых насекомых, содержатся определенные белки и гликопротеины, называемые антифризными (соответственно *AFP и AFGP*), обусловливающие неколлигативное снижение точки замерзания сыворотки крови. Такое понижение существенно выше прогнозируемого эффекта от концентрации полимерных растворенных веществ. Благодаря этим белкам точка замерзания сыворотки крови некоторых антарктических рыб примерно на 1,4 °С ниже, чем у других. *AFP* и *AFGP* связываются с кристаллической решеткой льда и замедляют рост его кристаллов.

Известно несколько типов *AFP*. Предложены различные механизмы специфического связывания *AFP* с кристаллической решеткой льда, предполагающие вовлечение в этот процесс водородных связей, энтропийных эффектов и сил Ван-дер-Ваальса [16]. В работе [17] исследовался *AFP* в выловленной зимой камбале. Данные *AFP* представляет собой одиночную α-спираль с последовательностью ***Asp-Thr-Ala-Ser-Asp-Ala$_6$-Leu-Thr-Ala$_2$-Asn-Ala-Lys-Ala3-Glu-Leu-Thr-Ala$_2$-Asn-Ala$_7$-Thr-Ala-Arg*** (четыре участка, выделенные полужирным шрифтом, связываются со льдом). Группировка этих участков в полипептидной цепи совместима с топологией поверхности льда, благодаря чему остатки аминокислот во всех связанных со льдом участках совместно образуют пять-шесть водородных связей с молекулами воды в кристаллах. Соответствующая последовательность аминокислотных остатков необходима также для связывания белка с помощью Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Антифризные свойства белков можно использовать при производстве замороженных пищевых продуктов, поскольку они способны ингибировать рост кристаллов льда и замедлять скорость его перекристаллизации.

14.5.3. Взаимодействия «белок–белок»

В пищевых продуктах содержится очень много самых разных белков независимо от их конкретного источника. В молоке, например, присутствуют казеины, α-лактальбумин, β-лактоглобулин, сывороточный альбумин, иммуноглобулины и протеозопептоны; в мясе — миофибриллярные белки, коллагены и саркоплазматические белки (в основном ферменты); в зерне злаковых культур — смесь альбуминов, глобулинов, проламинов и глютелинов. Белки отличаются по размеру, форме, а также по аминокислотному составу и последовательности аминокислот, и в результате — по своим функциональным свойствам в пищевых системах. Взаимодействия различных реакционноспособных групп (в частности, тиольных) и гидрофобных участков на поверхности белковых молекул приводят к образованию ковалентных и нековалентных межмолекулярных связей с последующей агрегацией и/или полимеризацией белков. Подобные молекулярные превращения изменяют такие функциональные свойства белков, как гидратацию, растворимость, вязкость растворов, пленко- и гелеобразование, а также адсорбцию на поверхности раздела между водной и жировой фазами (см. главу 5).

14.6. Взаимодействия между липидами и белками

В эмульсионных продуктах, образованных по типу «масло-в-воде» (молоко, сливки, мороженое, сыры, салатные дрессинги, майонез и различные продукты на основе мясного фарша), структурирующую роль выполняют жировые глобулы, распределенные в водной дисперсионной среде. Эти глобулы стабилизируются при взаимодействиях с белками, лецитинами или синтетическими поверхностно-активными веществами. В процессе хранения охлажденного молока взаимодействие липопротеиновых мембран жировых глобул с сывороточным белком приводит к образованию кластеров, флокуляции жировых глобул и образованию сливок. Напротив, кластеризация жировых глобул вокруг пузырьков воздуха обеспечивает желаемые характеристики текстуры мороженого.

В пищевых эмульсиях, образованных по типу «вода-в-масле», структурирующую роль выполняют капли воды, стабилизируемые взаимодействиями с частицами твердого жира, моноацилглицеринами и фосфолипидами или белками, которые концентрируются на поверхности раздела воды и жировой фазы. В зависимости от их размера и распределения они влияют на реологические и органолептические свойства, а также на стойкость таких продуктов к микробиологической порче.

В пшеничной муке содержится ряд низкомолекулярных белков, содержащих большое количество цистеина и диаминокислот. К этому классу белков относятся тионины, лиголин, белки-переносчики липидов и пуроиндолины. В нативном состоянии они способны спонтанно связывать липиды или липидные комплексы. Такие связывающие липиды белки облегчают распределение жировой фазы на поверхности раздела «воздух–вода» в виде мономолекулярного слоя. Известно, что высокоэффективными стабилизаторами пены являются пуроиндолины. Взаимодействие пуроиндолина-*а* с лизофосфатидилхолином оказывает синергическое действие на стойкость пены в пищевой системе [6].

14.7. Взаимодействия полисахаридов

Взаимодействия полисахаридов друг с другом, с ионами, белками и липидами влияют на различные функциональные свойства пищевых систем, включая влагоудерживающую способность, геле- и пленкообразование, вязкость и другие реологические свойства жидкостей, ингибирование роста кристаллов, а также на образование и стабильность пен и эмульсий. Эти свойства во многом обусловливают органолептические свойства мясных и рыбных продуктов, молочных гелей, сливок, жидких заварных кремов, мороженого, салатных дрессингов, тортов, варенья и джемов, мармеладов, желе, фруктовых и быстрорастворимых концентратов напитков. В качестве стабилизаторов эмульсий и загустителей широко используются модифицированные крахмалы. Полисахариды также служат комплексообразующими агентами для газов, жидкостей и твердых веществ в пищевых продуктах. К взаимодействиям полисахаридов относятся поверхностная сорбция и включение инородных молекул («гостей») в амилозную спираль и короткие спирали амилопектина, а также в капилляры между зернами крахмала [18].

Микроструктура крахмальных зерен состоит из комплексов, образованных шестью двойными спиралями амилозы, которые формируют гексагональный элемент с канальцем в центре, вмещающим около 36 молекул воды. При замачивании в воде нативный гранулированный крахмал набухает, поглощая до 30 %масс. влаги (главным образом в аморфной области полимера). Это набухание обратимо, так как поглощенную воду можно удалить сушкой при комнатной температуре. При нагревании набухшие зерна утрачивают двойные спирали и, следовательно, кристаллическую структуру, необратимо превращаясь в клейстеризованный крахмал. Температура клейстеризации составляет 50–70 °С и зависит от ботанического происхождения источника крахмала (см. главу 3). В присутствии соли и некоторых низкомолекулярных гидрофильных компонентов из-за конкуренции этих мелких компонентов с крахмалом за доступные молекулы воды температура возрастает. Дальнейшее нагревание и сдвиг при избытке влаги приводят к усилению набухания крахмальных зерен с образованием очень вязких клейстеров. При охлаждении такого крахмального клейстера формируется сеть, дополнительно увеличивающая вязкость, в результате чего сильно гидратированная масса превращается в гель.

В ходе длительного хранения клейстера или геля постепенно вновь формируется биспиральная кристаллическая структура и происходит агрегация полисахаридных цепей с участем межмолекулярных водородных связей. Этот процесс называется ретроградацией крахмала, а такой крахмал характеризуется пониженной влагоудерживающей способностью. Скорость ретроградации зависит от типа крахмала (то есть от сооотношения в нем содержания амилозы и амилопектина), содержания липидов и температуры хранения [9]. Ретроградация амилозных гелей происходит за несколько часов, тогда как ретроградация амилопектиновых гелей — за сутки или недели. В хлебобулочных изделиях ретроградация проявляется в виде черствения (см. раздел 14.12.4), а в гелях она приводит к образованию дендритов.

Гидратация нейтральной полимерной сети зависит от интенсивности взаимодействий вещества с растворителем. Иммобилизация молекул воды в значительной степени обусловлена водородными связями с гидрофильными группами полисахарида или гидроколлоида. С другой стороны, в случае гелей полиэлектролитов (например, пектинов) на набухание влияет аккумуляция в полимерной сети противоионов, вследствие чего возникают различные эффекты. Такие противоионы в соответствии с требованием электрической нейтральности накапливаются в геле в концентрации, превышающей их концентрацию во внешней среде, что приводит к разнице осмотического давления между гелем и средой и, как следствие, к усилению набухания. Влияние осмотического давления зависит от заряда полимера и ионной силы. С другой стороны, поперечная сшивка пектиновых цепей через Ca^{2+}-опосредованные электростатиче-

ские связи противодействует расширению сети и ослабляет набухание (происходит так называемое Ca^{2+}-упрочнение) [19].

В стенках растительных клеток волокна целлюлозы скреплены гемицеллюлозами и пектиновыми веществами. При тепловой обработке гемицеллюлозы частично растворяются, а целлюлоза остается нерастворимой. Растворимость гемицеллюлоз при тепловой обработке можно повысить путем увеличения pH среды. Поэтому овощи (особенно семена бобовых растений), остающиеся твердыми при варке в кислых или нейтральных условиях, в щелочных водных растворах размягчаются (в воду, в которой варят фасоль, иногда добавляют $NaHCO_3$). Сила воздействия пектиновых веществ зависит от степени зрелости овощей. В ходе созревания нерастворимые протопектины ферментативно преобразуются в растворимые пектины. В щелочной среде свободные карбоксильные группы пектинов образуют растворимые соли, способствующие размягчению овощей при варке.

Взаимодействие воды с различными растительными гидроколлоидами (камедями) обычно не приводит к гелеобразованию. Вместо этого из-за большого размера молекул полимеров даже при низких концентрациях образуется очень вязкий псевдопластичный раствор. Реологические свойства растворов нейтральных камедей не зависят от значения pH, тогда как вязкость растворов полимеров с ионогенными группами во многом зависит от pH системы [20].

Полианионные гидроколлоиды связывают катионные противоионы электростатически. В зависимости от типа анионной группы полисахарида ($-COO^-$, $-PO_3^{2-}$ или $-OSO_3^-$) и свойств катионов противоионы связываются или через их гидратные оболочки, или после смещения гидратных оболочек. Связующее сродство различных катионов к разным анионным гидроколлоидам, например к карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ) или каррагинану, следует учитывать при использовании камедей в пищевых системах.

Межполимерные взаимодействия в смешанных растворах полисахаридов зачастую приводят к увеличению вязкости растворов и (в некоторых случаях) к гелеобразованию. Степень синергизма зависит от химического состава и структуры соответствующих гидроколлоидов. Гелеобразующую способность агарозы, каррагинана и фурцелларана можно повысить добавлением других, не образующих гель полисахаридов. Так, добавление к каппа-каррагинану КРД (камеди рожкового дерева) и других галакто- и глюкоманнанов повышает гелеобразующую способность системы. Для объяснения этого явления предложено несколько гипотез, а именно: межмолекулярное водородное связывание между двумя взаимодействующими полисахаридами; самоагрегация цепей галактоманнана в присутствии сети каппа-каррагинана, а также влияние исключенного объема, обусловленное несовместимостью полимеров в смеси. Добавление глюко- или галактоманнанов к ксантановой камеди оказывает синергическое действие на ее способность образовать термообратимые гели даже при общей концентрации полисахарида 0,5%. Этот эффект, возможно, обусловлен специфическими взаимодействиями между макромолекулами ксантана и незамещенными («гладкими») последовательностями другого полимера. Свойства гелей на основе альгинатов и высокометоксилированного пектина можно регулировать за счет синергизма этих полимеров по отношению друг к другу. Например, альгинаты сами по себе в присутствии многовалентных катионов способны образовывать прочные гели, однако при низких значениях pH они осаждаются, тогда как пектины образуют гели в отсутствие катионов при низких значениях pH и в присутствии около 40% сахарозы. С другой стороны, смесь альгината и пектина (0,6%) в пропорции 1 : 1 образует гель при низких значениях pH и при высоком содержании растворимых сухих веществ. Такой синергизм может быть обусловлен межмолекулярными взаимодействиями этих полимеров — полигулуроновая кислота (альгинат) и этерифицированная метилом полигалактуроновая кислота (пектин) могут упаковываться в параллельные двуслойные кристаллические структуры [21]. При взаимодействиях крахмала с различными камедями могут меняться вязкость, скорость гелеобразования и реологические свойства гелей.

14.8. Взаимодействия между полисахаридами и липидами

Взаимодействия полисахаридов с липидами в водных системах обусловлены гидрофобными эффектами. Типичным примером может служить связывание молекулы моноацилглицерина во внутренней полости спиралевидных структур амилозы. В результате образуется амилозо-липидный комплекс, структура которого подобна структуре известного амилозо-йодного комплекса. При замесе теста образование амилозо-

липидного комплекса снижает набухание зерен крахмала и повышает температуру клейстеризации [8]. Нагревание при выпечке еще больше увеличивает степень связывания липидов амилозой. Амилозолипидные комплексы способны к гелеобразованию, и реологические свойства этих гелей зависят от концентрации и типа липидов, а также от кристаллической формы комплексов. Добавление липидов, особенно фосфолипидов, замедляет ретроградацию крахмального клейстера и размягчает мякиш путем взаимодействия липидных мицелл с гидрофильными сегментами крахмала. Такие взаимодействия поддерживают гелеобразование в различных крахмальных системах [22].

Взаимодействия липидов с гидроколлоидами обусловливают отличные эмульгирующие свойства гуммиарабика. Несмотря на большую молекулярную массу этого полисахарида (260–160 кДа), растворы гуммиарабика очень маловязкие. Оба этих свойства являются результатом уникального состава гуммиарабика — трехкомпонентной смеси полисахаридов из *L*-арабинозы, *L*-рамнозы и *D*-глюкуроновой кислоты, образующих арабиногалактан-белковый комплекс (*AGP*) с большой молекулярной массой, гликопротеин и арабиногалактан. В *AGP* несколько компактных гидрофильных полисахаридных структур ковалентно связаны с крупной полипептидной цепью, расположенной, возможно, на периферии комплекса. Такая структура с гидрофобными аминокислотными остатками, обращенными к жировой фазе, обусловливает возможность адсорбции камеди на поверхности раздела «масло–вода». Термическая денатурация этого белкового компонента приводит к утрате эмульгирующей способности камеди.

Взаимодействия полисахаридов с липидами можно использовать в производстве низкокалорийных пищевых эмульсий. Двухпроцентная водная дисперсия микрокристаллической целлюлозы обладает той же вязкостью, что и 60%-ная эмульсия, образованная по типу «масло-в-воде» (по-видимому, из-за образования внутренней трехмерной сети). 20%-ная эмульсия соевого масла в водном растворе, содержащем 1–1,5% коллоидной микрокристаллической целлюлозы и 0,5% эмульгатора (полиэтиленоксидсорбитанмоностеарата), по таким свойствам, как вязкость, текучесть, предел текучести и стабильность, способна имитировать 65%-ную эмульсию чистого масла [21].

14.9. Взаимодействия между полисахаридами и белками

Некоторые гидроколлоиды взаимодействуют с белками. В молочных продуктах такие взаимодействия могут привести к дестабилизации белков и/или предотвратить нежелательную седиментацию ионами Ca^{2+} Нейтральные полисахариды (камедь рожкового дерева и гуаровая камедь), а также большинство полианионных полимеров (включая слабокислый гуммиарабик, карбоксиметилцеллюлозу, пектин, гиалуроновую кислоту, альгинаты, агарозу, гепарин, хондроитинсульфаты, сульфат целлюлозы и фукоидан) при pH 6,8 не эффективны для предотвращения осаждения казеиновых мицелл и α_{S1}-казеина ионами Ca^{2+} С другой стороны, каррагинаны, особенно каппа-каррагинан, образуют с α_{S1}-казеином стабильные комплексы, но природа этого взаимодействия до конца не ясна [21].

В концентрированных растворах биополимеры плохо смешиваются друг с другом. Из-за этой термодинамической несовместимости концентрированная смесь водного раствора биополимеров при смешивании разделяется на две водные фазы (иногда ее называют эмульсией типа «вода-в-воде») [23]. Порог концентрации для разделения фаз зависит от типов биополимеров в системе. Смеси глобулярных белков разделяются на фазы только при превышении минимальной концентрации (12%), а смеси белков и полисахаридов разделяются при значительно более низкой концентрации (около 4%, рис. 14.21). При смешивании двух биополимерных растворов получающаяся смесь остается гомогенным изотропным раствором в тех случаях, когда общая концентрация биополимеров ниже пороговой. Тем не менее, при превышении пороговой концентрации раствор разделяется на две фазы, и сначала в зависимости от фазового объема первая водная фаза, обогащенная одним из биополимеров, диспергируется в непрерывной водной фазе, обогащенной другим биополимером. Так как обе эти фазы являются водными, такое разделение визуально незаметно. В ходе хранения или центрифугирования этой системы эмульсия, образованная по типу «вода-в-воде» разделяется на две части (верхняя часть — это водный раствор, богатый одним из биополимеров, а нижняя — раствор, богатый другим биополимером).

Типичная фазовая диаграмма смесей двух белковых растворов и растворов полисахарида и белка в равновесном состоянии приведена на рис. 14.22. Бинодальная кривая отражает равновесные концен-

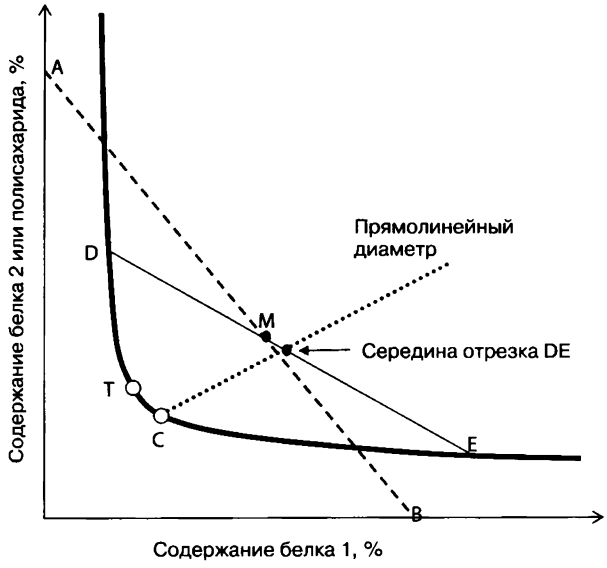


Рис. 14.22. Типичная фазовая диаграмма для бинарной смеси двух биополимеров в водных растворах. *DE* — рабочая линия; *T* — пороговый состав; *C* — критическая точка. По [23]

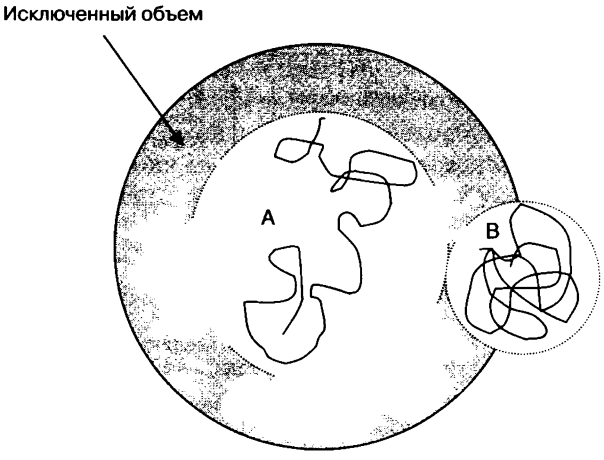


Рис. 14.23. Схематическая иллюстрация исключенного объема в смесях биополимеров. По [23]

A доступное для *B* пространство в растворе уменьшается из-за увеличения общего исключенного объема. Следовательно, молекулы *B* вынужденно обособляются и выделяются, захватывая с собой некоторую часть растворителя. Биополимеры в виде случайной спирали, такие как желатин, характеризуются значительно большим исключенным объемом, чем глобулярный белок аналогичной массы, и поэтому они вызывают разделение фаз при значительно меньшей концентрации, чем глобулярные белки. Это явление наблюдается и в случае полисахаридов.

В смесях биополимеров разделение фаз может происходить и в результате процесса, называемого «деплетивной флокуляцией». Рассмотрим биополимер со случайной спиралью, например, желатин или полисахарид, в растворе глобулярного белка (рис. 14.24). Если пространство между двумя молекулами глобулярного белка меньше энтропийно благоприятного увеличенного размера полимера со случайной спиралью, последний покидает это пространство. Из-за этого создается локальный градиент концентрации, что приводит к возникновению градиента осмотического давления, и в результате молекулы глобулярного белка «выдавливаются» в одну область раствора, а молекулы полимера со случайной спиралью — в другую, что приводит к разделению фаз.

Так как в большинстве пищевых продуктов смеси белков и полисахаридов присутствуют в концентрациях, превышающих пороговую, то разделение фаз является скорее не исключением, а правилом. Такое разделение фаз следует учитывать при составлении рецептуры (смеси ингредиентов), поскольку оно может влиять на органолептические свойства готового изделия. Пример влияния такого разделения фаз на текстуру гелей приведен на рис. 14.25. Разделение фаз приводит к неоднородному распределению биополимеров в исходной рецептурной смеси, вызывающему при переработке неоднородность текстуры геля, которая в зависимости от продукта может быть как желаемой, так и нежелательной.

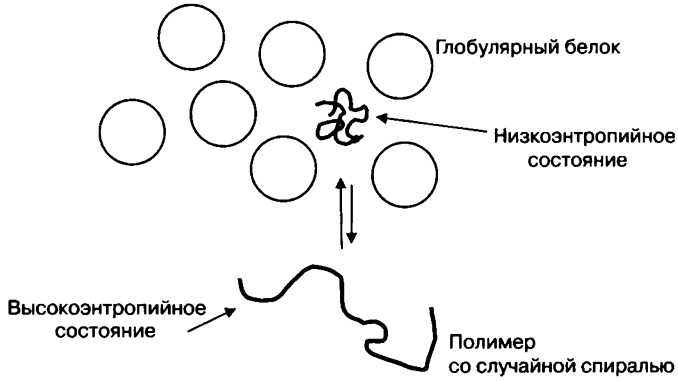


Рис. 14.24. Схематическое представление деплетивной флокуляции при разделении фаз в смесях биополимеров. По [23]

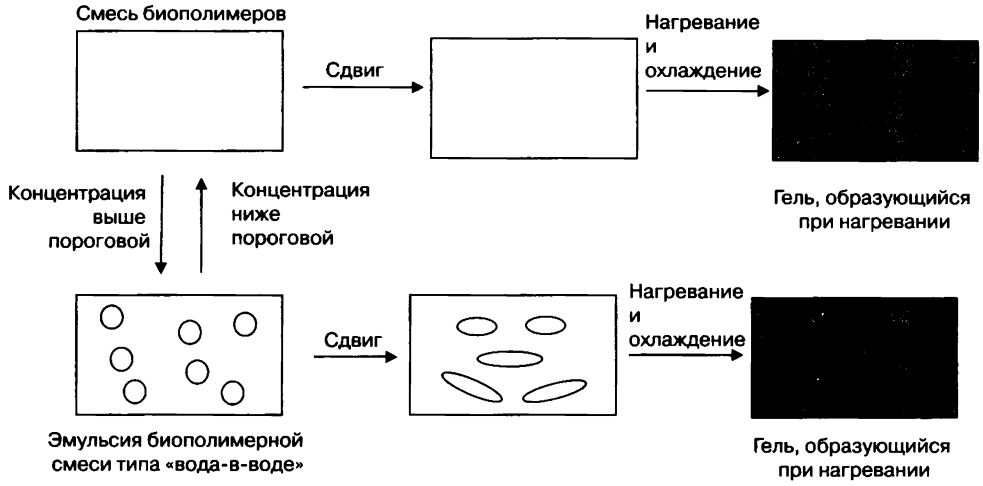


Рис. 14.25. Пример влияния разделения фаз на свойства текстуры гелей. По [23]

14.10. Влияние химических и физических взаимодействий на цвет пищевых продуктов

14.10.1. Изменения гемопротеинов

На цвет мяса убойных животных, рыбы, моллюсков и ракообразных влияет содержание и химическое состояние гемопротеинов, прежде всего миоглобина MbFe(II) и (в меньшей степени) гемоглобина, цитохромов и гемоцианина. Химические аспекты изменения цвета гемопротеинов более подробно рассмотрены в главе 16.

14.10.2. Взаимодействия каротиноидов

Цвет многих овощей и фруктов обусловлен каротиноидами, зачастую представляющими собой смеси нескольких десятков соединений (об источниках различных каротиноидов см. главу 7). Каротиноиды легко окисляются на воздухе и на свету, но довольно стабильны при температурах приготовления пищи. Окисление каротиноидов в ходе переработки и хранения приводит к утрате характерного для многих пищевых продуктов цвета. Типичным примером может служить появление бурых пятен на красном сладком перце при хранении вследствие окисления капсантина. Побочным результатом окисления каротиноидов является образование вкусоароматических соединений [24].

Кожа многих рыб и панцири морских ракообразных окрашены в яркие цвета — желтый, оранжевый, красный, пурпурный, голубой, серебристый или зеленый. Основными пигментами в этом случае являются различные каротиноиды, в частности астаксантин и кантаксантин, присутствующие в виде нековалентных комплексов с белками, гликопротеинами, фосфорилированными гликопротеинами, гликолипопротеинами и липопротеинами [25]. Диссоциация этих каротинопротеиновых комплексов в ходе хранения рыбы, особенно при прямом ярком свете, приводит к снижению интенсивности окраски.

Основным каротиноидным компонентом в панцире омара является красный астаксантин. У живого омара он присутствует в форме водорастворимого каротинопротеина — крустацианина серо-голубоватого цвета, и поэтому свежий омар имеет голубой или серо-голубоватый цвет. При варке омара в воде этот белковый комплекс денатурируется с высвобождением свободного астаксантина, придающему вареному омару ярко-красный цвет.

14.10.3. Взаимодействия антоцианов

Антоцианы — гликозиды полигидрокси- и полиметоксильных производных с катионом флавилия — образуют большую группу основных пигментов цветов и фруктов (см. главу 9). Их красная, фиолетовая или синяя окраска зависит от структуры и значения pH водных сред. Гидрофобные взаимодействия и водо-

родные связи между различными антоцианами и некоторыми другими присутствующими в растениях фенольными кислотами и алкалоидами влияют на интенсивность цвета и изменяют характеристики светопоглощения. В красных винах изменения цвета в процессе выдержки обусловлены реакциями конденсации между антоцианами и другими фенольными соединениями, а также образованием других антоциановых пигментов в реакциях с пировиноградной кислотой. Их различные производные могут иметь голубой, желтый, оранжевый, оранжево-красный, красный или коричневый цвет [26].

В пищевых продуктах антоцианы относительно нестабильны. Они подвержены ферментативному расщеплению и распаду под действием света, тепла, кислорода, кислых сред и окисления аскорбиновой кислоты. При длительном хранении пастеризованные фруктовые соки могут постепенно обесцвечиваться или темнеть из-за реакции полимеризации. В присутствии Al, Fe и Sn в переработанных фруктах могут образовываться пурпурно-синие или синевато-серые пигменты [24].

14.10.4. Неферментативное потемнение и образование черных пятен

Соединения, образующиеся на ранних стадиях реакций Майяра, как правило, бесцветны или бледно-желтые. Их называют предшественниками меланоидинов, имеющих бурую окраску. Бесцветные низкомолекулярные (< 1 кДа) продукты образуются в основном при реакциях со свободными аминокислотами. Меланоидины, бурые высокомолекулярные полимерные продукты реакций Майяра, образуются преимущественно в результате полимеризации промежуточных продуктов и/или реакций с реакционноспособными группами аминокислотных остатков в белках. Последний механизм в пищевых продуктах встречается чаще. Реакции окисленных липидов с белками приводят к образованию окрашенных соединений, подобных образующимся при реакциях Майяра или при ферментативных реакциях потемнения. Гидропероксиды липидов или их продукты распада взаимодействуют со свободными аминокислотами с образованием желтых или бурых продуктов реакции. Особенно высока скорость потемнения при реакциях с цистеином, метионином и триптофаном. Аналогичные реакции происходят также между способными к окислению липидами и белками. Поскольку ненасыщенные жиры более предрасположены к окислению, чем насыщенные, то в тканях, богатых жирами с полиненасыщенными жирными кислотами (например, в мышечной ткани рыб), интенсивность потемнения выше.

Реакция потемнения особенно нежелательна для белого мяса птицы или рыбы, в котором бурые пятна образуются даже при хранении в охлажденном или замороженном состоянии. Такие бурые или даже черные пятна могут быть также следствием ферментативных реакций. Цвет панциря и подпанцирных слоев ракообразных (омаров, крабов и креветок) ухудшается после вылова в результате меланоза, проявляющегося в виде появления очень темных, почти черных пятен. Ферментативное потемнение инициируется эндогенной полифенолоксидазой (*PPO*) и сопровождается неферментативной полимеризацией. На ферментативной стадии монофенолоксидаза катализирует окисление тирозина до дигидроксифенилаланина (*DOPA*), а окисление последнего катализируется дифенолоксидазой. *DOPA* полимеризуется с образованием черных высокомолекулярных пигментов. Кроме того, *DOPA* может также вступать в реакцию с остатками цистеина, тирозина и лизина в белках, вовлекая белки в реакцию полимеризации. Обширное почернение у ракообразных представляет собой серьезный дефект. Для предотвращения образования черных пятен в целях восстановления хинона до бесцветного *DOPA* используют различные сульфитирующие вещества. Подобные реакции также происходят в бананах, инжире, персиках, яблоках, картофеле, орехах и зерновых продуктах. Так как они значительно ухудшают сенсорное качество многих пищевых продуктов, в пищевой промышленности с такими реакциями связаны большие экономические потери.

14.10.5. Обесцвечивание из-за связывания ионов металлов

Во многих пищевых продуктах содержатся следовые количества металлов с переменной валентностью, особенно Fe^{2+}, Fe^{3+} и Cu^{2+}. При хранении или нагревании пищевых продуктов растворенные ионы металлов распределяются между жировой и водной фазами. Ионы, растворенные в жировой фазе, в основном связываются с жирными кислотами в виде недиссоциированных солей или с фосфолипидами, что придает жировой фазе коричневатую окраску. Ионы в водной фазе могут реагировать с фенольными веществами с образованием окрашенных комплексов — например, комплексы Fe^{2+} с производными пирокатехина или пирогаллола синего или фиолетового цвета, а аналогичные комплексы с ионами Fe^{3+} — оранжевого или коричневого.

14.11. Влияние химических и физических взаимодействий на вкус и аромат пищевых продуктов

14.11.1. Взаимодействия вкусоароматических соединений с основными компонентами пищевых продуктов

Воспринимаемый вкус и аромат продукта преимущественно обусловлен концентрацией летучих вкусоароматических соединений в газовой среде над ним (то есть в газообразной фазе, попадающей ретроназально в носовую полость при пережевывании кусочка пищи). Эта концентрация при любой заданной температуре зависит от концентрации летучих соединений в пище, от их летучести, определяемой в основном свойствами водяного пара из слюны, и от их сродства с другими компонентами пищи.

Вкусоароматические соединения в пищевых продуктах связаны с белками, липидами или полисахаридами. В зависимости от структуры летучих и захватывающих их соединений их связь обеспечивается гидрофобными взаимодействиями, а также водородными, ионными или ковалентными связями. Такой «захват» снижает летучесть молекул и тем самым уменьшает скорость потери вкуса и аромата при хранении продуктов. Стабильность пищевой системы зависит от значений pH и температуры. Многие вкусоароматические соединения гидрофобны или, по крайней мере, в их состав входят гидрофобные фрагменты, которые избирательно накапливаются в жировой фазе.

Известно, что в пищевых системах гидроколлоиды снижают интенсивность восприятия вкусоароматических веществ. В зависимости от свойств вкусоароматических соединений и гидроколлоидов снижение интенсивности аромата может быть следствием связывания летучих соединений или снижения скорости диффузии из-за повышения вязкости или разветвленности полимерной сети. В хлебобулочных изделиях многие вкусоароматические соединения удерживаются в спиралях молекул амилозы, и при нагревании ломтика хлеба такие захваченные соединения высвобождаются, повышая интенсивность аромата.

Одним из способов ингибирования нежелательных реакций вкусоароматических добавок с пищевыми компонентами при хранении и защиты этих добавок от испарения и химического распада при переработке пищевых продуктов является их инкапсулирование, в ходе которого образуются молекулярные инклюдированные комплексы из циклодекстрина и вкусоароматического соединения. В этих микрокапсулах гидрофобные фрагменты или полные молекулы вкусоароматического соединения удерживаются в гидрофобной полости циклодекстрина, тогда как внешняя гидрофильная часть циклодекстрина обеспечивает водорастворимость и дисперсность. Образование таких инклюдированных комплексов зависит от концентрации молекул «гостя» и совместимости размеров вкусоароматических соединений с полостью циклодекстрина. Подобное комплексообразование существенно повышает стабильность различных вкусоароматических соединений, особенно в изделиях, подвергаемых высокотемпературной обработке (в частности, в леденцовой карамели). Вместе с тем при употреблении готового продукта это может привести к недостаточному высвобождению некоторых вкусоароматических соединений из полости циклодекстрина [27].

Известно, что различные вкусоароматические соединения посредством гидрофобных взаимодействий связаны с белками. Опубликовано довольно много работ о связывании спиртов, альдегидов, кетонов и других летучих соединений различными белками, особенно соевыми и молочными [28].

Одной из причин изменений аромата многих продуктов при хранении является разная летучесть содержащихся в них вкусоароматических соединений.

14.11.2. Гидролитические реакции

Происходящие при созревании говядины изменения вызывают не только желаемую тендеризацию мяса, но и повышают содержание свободных аминокислот, накопление которых может усиливать аромат жареного мяса. Увеличение концентрации свободных аминокислот в тендеризованном мясе обусловлено в основном эндогенными протеолитическими ферментами лизосом. Электростимуляция говяжьих туш способствует высвобождению этих ферментов и тем самым накоплению свободных аминокислот. Кроме того, аминокислоты могут высвобождаться благодаря активности трансаминазы. Увеличение концентрации глутаминовой кислоты в созревшей говядине может быть обусловлено ферментативным перемещением α-аминогруппы аланина на 2-кетоглутаровую кислоту [29].

14.11.3. Окислительные реакции

Используемые при посоле мяса нитраты действуют и как мощные антиоксиданты в мясных продуктах, подвергаемых тепловой обработке. Считается, что их антиоксидантная активность может основываться на нескольких механизмах, в том числе на ингибировании Fe-каталитического окисления посредством комплексообразования с помощью ионов металлов. Нитрит легко вступает в реакцию с малоновым диальдегидом (вторичным продуктом окисления липидов), образуя высокомолекулярные соединения [30]. Эта реакция ограничивает возможность оценки окислительной порчи липидов посоленного мяса путем использования 2-тиобарбитурового теста (2-ТБК-теста).

Роль окисленных липидов в развитии прогоркания хорошо известна. Соединения, вызывающие прогоркание, особенно карбонильные, реагируют с аминокислотами и белками с образованием очень неприятного постороннего запаха. В присутствии полиненасыщенных жирных кислот образуются 2,4-алкадиенали и конъюгированные алкатриенали, вступающие в реакции с аминокислотами с образованием типичного «рыбного» привкуса.

В большинстве пищевых продуктов растительного происхождения присутствуют терпены, которые легко окисляются при хранении продуктов и их нагревании с образованием различных запахов. Окисленные терпены и продукты расщепления промежуточных гидропероксидов, в том числе свободные радикалы, вступают в реакции с аминокислотами и белками, образуя многочисленные соединения, вызывающие нежелательные привкусы и запахи.

14.12. Влияние химических и физических взаимодействий на текстуру и реологические свойства пищевых продуктов

14.12.1. Денатурация белков при замораживании

При хранении замороженной рыбы, особенно семейства тресковых (*Gadidae*), поперечная сшивка миофибриллярных белков приводит к их денатурации. В результате мясо становится жестким и утрачивает многие свойства, главным образом влагоудерживающую, эмульгирующую и гелеобразующую способности, также снижается активность АТФазы, что свидетельствует о нежелательных изменениях белков. Степень этих изменений по мере увеличения продолжительности и температуры хранения в замороженном состоянии возрастает. Такая поперечная сшивка белков, особенно у тресковых рыб, вызывается реакцией формальдегида, продуцируемого эндогенной триметиламин-N-оксиддеметилазой, с реакционноспособными группами белков. Поперечной сшивке белков могут также способствовать способные к окислению липиды (путем свободнорадикальной полимеризации и конденсации белкового амина с диальдегидами, образующимися как вторичные продукты окисления липидов). Эффективно ингибируют эти нежелательные изменения в замороженной жирной рыбе природные антиоксиданты (за исключением аскорбиновой кислоты), зачастую представляющие собой неочищенные смеси растительных экстрактов. Денатурация белков при замораживании особенно проявляется в рыбном фарше, поскольку разрушение структуры мышечной ткани благоприятствует взаимодействию ферментов с субстратами и усиливает окисление липидов (особенно в фаршах на основе темного мяса, богатого гемосоединениями).

Эти нежелательные взаимодействия можно минимизировать путем экстрагирования водорастворимых белков и небелковых азотистых соединений, в том числе триметиламин-N-оксида, многих пигментов, прооксидантов и ионов, а также путем удаления большинства липидов. Остаточный концентрат миофибриллярного белка, известный как сурими, обладает значительно лучшими функциональными свойствами, чем исходный рыбный фарш, и более стоек к денатурации при замораживании. Тем не менее, при производстве сурими из рыбного фарша теряется около 30% сырого белка.

Дополнительное ингибирование реакций поперечной сшивки достигается внесением различных веществ, снижающих температуру замораживания, увеличивающих вязкость тканевого сока или избирательно взаимодействующих с аминокислотными остатками белков. В различных запатентованных смесях для производства сурими наиболее распространенными криопротекторами являются сахароза, сорбит, маннит, альгинаты, полифосфаты, цитраты, аскорбат и хлорид натрия. Показано, что в модельных системах и в сурими эффективны некоторые амино- и гидроксикарбоновые кислоты, разветвленные олигоса-

хариды и аденозиннуклеотиды. Имеются данные, что наиболее эффективно предотвращают денатурацию миофибриллярных белков рыбы при замораживании те аминокислоты, которые обладают большим результирующим отрицательным зарядом. Как правило, в низкомолекулярных соединениях, пригодных для использования в качестве криопротекторов, содержится несколько реакционноспособных групп, расположенных в молекуле соответствующим образом. Криостабилизация белков в сурими описана в работе [31].

14.12.2. Поперечные сшивки в гелях

Пищевые гели могут быть получены из белков и полисахаридов благодаря нековалентным (иногда ковалентным) взаимодействиям между различными функциональными группами полимерных цепей. Кроме того, при этом могут использоваться взаимодействия с эндогенными или экзогенными низкомолекулярными соединениями. Полимеры способны к взаимодействию в тех случаях, когда они находятся в растворах, дисперсиях, мицеллах или в измельченных тканевых структурах. О поперечной сшивке белков в пищевых гелях см. главу 5.

Гелеобразование белков при нагревании является ключевым фактором для формирования желаемой текстуры вареных колбас и желатинизированных рыбных продуктов типа камабоко. В производстве последних (сырьем является сурими) часто применяют двухступенчатое нагревание, то есть желатинизацию при температуре около 40 °С, что обеспечивает перекрестную сшивку, катализируемую эндогенной трансглютаминазой, с последующим нагреванием до требуемой температуры. Способность миофибриллярных белков различных видов рыб к гелеобразованию в большой мере зависит от эндогенной активности протеиназы. Из-за чрезмерного протеолиза в мясе разных видов рыб (например, тихоокеанского мерланга, минтая, новозеландского макруронуса или волнистого атлантического горбыля) происходит нежелательное размягчение приготовленных из сурими гелей. Предотвратить эти нежелательные изменения гелей можно путем внесения различных ингибиторов протеиназ (например, белка плазмы говяжьей крови, бычьего сывороточного альбумина, сухого яичного белка или экстрактов картофельного белка).

14.12.3. Образование биоразлагаемых пленок

Биоразлагаемые пленки можно использовать для упаковки пищевого продукта, если они имеют соответствующие барьерные и механические свойства. Такие пленки намного меньше загрязняют окружающую среду, чем некоторые другие материалы. В производстве пищевых продуктов они могут применяться как съедобные носители ингредиентов и бактерицидных веществ, а также как своего рода «подложки» для ферментов. Эти пленки могут быть получены из различных полисахаридов, белков, белково-полисахаридных или белково-жировых смесей. Свойства таких пленок обусловлены характеристиками компонентов и взаимодействиями между полимерами и другими соединениями.

Стадии приготовления съедобных белковых пленок включают начальную денатурацию молекул нагреванием, сдвигом или адсорбированием тонких слоев материала на поверхности раздела «воздух–вода». В смеси с денатурированными полимерами в соответствующей концентрации поперечная сшивка между полипептидными цепями индуцируется испарением растворителя, сдвигом в фильере или погружением в осадительную ванну.

В образовании когезионной и вязкоупругой пленки первоначально участвуют те же связи, что и отвечают за гелеобразование белков и полисахаридов. Как мы покажем на следующих примерах, определенным взаимодействиям способствует надлежащий выбор полимеров, используемых для производства многокомпонентных пленок, а также технологических параметров.

Хитозан благодаря своему положительному заряду может образовать в слабокислой среде электростатические поперечные связи с альгинатами, пектинами и другими кислотными полисахаридами. Барьерные свойства пленок, приготовленных из белковых смесей, и их прочность при растяжении зависят от количества реакционно способных групп в компонентах и значения pH смеси. В белковых смесях нагревание при щелочных значениях pH позволяет увеличить количество –SH-групп, которые при сушке пленки образуют новые поперечные дисульфидные связи. Такая обработка обеспечивает повышенную прочность при растяжении, меньшую растворимость в воде и снижение проницаемости пленок для кислорода, летучих ароматических соединений и жиров. Ионизирующее облучение белковых пленок в соответствующих дозах приводит к поперечной сшивке благодаря реакции образующихся гидроксильных

радикалов с остатками тирозина. Дополнительная химическая или ферментативная поперечная сшивка может применяться для создания материалов с требуемой упругостью, достаточной прочностью при растяжении в условиях разной влажности и температуры, с низкой растворимостью в горячей воде, заданными барьерными свойствами и определенной способностью к биоразложению. Свойства материалов, изготовленных из анионных полимеров, можно модифицировать путем внесения двухвалентных катионов. В целях химической модификации белковых пленок используют преимущественно реагенты для поперечной сшивки, взаимодействующие с аминогруппами аминокислотных остатков (в основном это различные альдегиды или N-[3-(диметиламин)пропил]-N'-этилкарбодиимид, *EDC*). Тем не менее, при выборе реагентов для химической поперечной сшивки следует учитывать и токсикологические аспекты. Наиболее предпочтительным ферментативным методом модификации белковых пленок можно считать поперечную сшивку, катализируемую трансглютаминазой. При использовании ферментативной обработки или *EDC* можно значительно снизить растворимость пленок из рыбного желатина (или желатина и хитозана) в кипящей воде даже при низких значениях pH и увеличить прочность при растяжении [32].

14.12.4. Химические и физические взаимодействия в тесте и выпеченных хлебобулочных изделиях

Качество многих хлебобулочных изделий в большой степени зависит от образования в тесте различных белковых поперечных связей и от взаимодействий «белок–липид–полисахарид», необходимых для обеспечения требуемой пористой, аэрированной текстуры изделий. Поперечные связи образуются при замесе муки с водой и добавлении соли, а также на последующих стадиях хлебопечения. Тесто можно рассматривать как вязкоупругий гидратированный матрикс белков клейковины с внедренными в него зернами крахмала, фрагментами клеточных стенок различного размера, а также с нейтральными и полярными липидами, воздухом и газами брожения.

Смешивание с водой приводит к гидратации частиц муки, повышению растворимости белков, дезагрегации и переориентации глютениновых полимеров для образования мембранной сети. Высокое содержание в клейковине высокомолекулярных глютелинов и качественное замешивание являются важными предпосылками для образования хорошо растяжимых мембран, способных удерживать большое число мелких пузырьков газа. Стабилизацию пузырьков обеспечивают также загущающие и поверхностно-активные компоненты водной фазы теста, особенно пентозаны и полярные липиды муки. Это обеспечивает требуемую пористость и большой объем выпеченного изделия. Получению желаемой текстуры и внешнего вида хлеба способствуют многочисленные, равномерно распределенные поры в мякише (размером 1–2 мм).

Ключевую роль для образования требуемой структуры теста и выпеченного изделия играют меж- и внутрипептидные дисульфидные связи. В присутствии небольших растворимых белков и низкомолекулярных тиольных соединений некоторые поперечные дисульфидные связи из-за реакций обмена дисульфидами становятся подвижными (рис. 14.26). Внесение в тесто окислителей улучшает текстуру хлебобулочных изделий за счет стимулирования образования поперечных дисульфидных связей. При выпечке количество дисульфидных связей, повышающих стабильность структуры хлеба, увеличивается. Внесение в тесто аскорбиновой кислоты, которая является восстановителем, увеличивает упругость теста и способствует образованию пузырьков газа, улучшая текстуру и увеличивая объем хлеба. В свойства теста вносят свой вклад и другие ковалентные связи. Поперечная сшивка может вызываться дегидроаскорбиновой кислотой и продуктами ее термического расщепления, особенно метилглиоксалем, глиоксалем, диацетилом и треозой, вступающими в реакцию с лизиновыми остатками белков [33]. Кроме того, ковалентные поперечные связи могут быть результатом ферментативного образования альдегида γ-масляной кислоты, которое катализируется эндогенной диаминоксидазой, и последующего присоединения нуклеофильных аминокислотных остатков [34]. Укреплению структуры теста также способствуют гидрофобные взаимодействия в водных системах между неполярными аминокислотными остатками белков муки, особенно при выпечке, так как их энергия по мере повышения температуры возрастает. Этому могут также способствовать ионные силы отталкивания и притяжения, хотя и немногочисленные из-за малого количества ионизируемых остатков в зерновых белках, поскольку их энергия лишь ненамного меньше, чем энергия ковалентных связей [7, 35].

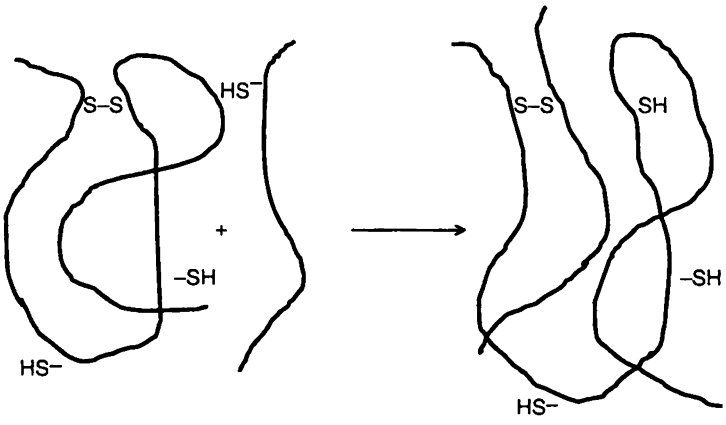


Рис. 14.26. Межмолекулярные реакции тиольных и дисульфидных групп

На структуру теста также существенно влияют водородные связи. По данным работы [36] клейковина образует сеть в результате агрегации частиц в основном под влиянием водородных связей и гидрофобных взаимодействий, а дисульфидные мостики, по всей вероятности, непосредственно в образование сети не вовлечены. Хотя водородные связи намного слабее ковалентных, они могут в больших количествах образовываться благодаря высокому содержанию в зерновых белках остатков глутамина и многочисленности гидроксильных групп в крахмале и пентозанах. Кроме того, значительный вклад в реологические свойства системы вносят взаимодействия между белками и крахмалом [37]. Релаксацию напряжений в сформованном тесте облегчают реакции обмена водородными связями при механических напряжениях.

На текстуру теста и хлебобулочных изделий также влияют гидротермические изменения в зернах крахмала, описанные в разделе 14.7. Степень набухания крахмала зависит от доступности воды в тесте в присутствии конкурирующих чрезвычайно гидрофильных проламинов, глютелинов и пентозанов. В случае недостаточного набухания крахмала мякиш обычно крошится, а слишком сильное набухание приводит к образованию недостаточно пропеченного мякиша. При температуре около 60 °С вязкость теста начинает возрастать благодаря денатурации белков муки и изменению крахмала. При этой температуре кристаллические участки амилопектина становятся аморфными, тогда как амилозо-липидные комплексы стабильны до температуры 110 °С, которая в мякише никогда не достигается. Эти изменения в присутствии расширяющегося воздуха и летучих продуктов брожения приводят, в конечном счете, к образованию пористой белково-крахмальной структуры. Тесто, которое можно рассматривать как пену, превращается в конце выпечки в губкообразный мякиш выпеченного изделия благодаря разрушению белковых мембран вследствие повышения внутреннего давления.

Роль липидов в образовании текстуры хлебобулочных изделий обусловлена их взаимодействиями с белками и крахмалом. Распространение липидов по поверхности раздела «воздух–вода», облегчаемое связанными с липидами белками, мы уже рассматривали в разделе 14.6, а взаимодействие липидов муки и липидных поверхностно-активных веществ с амилозой и амилопектином — в разделе 14.8.

При хранении хлебобулочных изделий происходит ретроградация крахмала и черствение. Мякиш постепенно высыхает и становится более жестким и менее упругим. Скорость черствения достигает максимума при температуре около 14 °С и снижается при температурах ниже –5 и около 60 °С. Ее можно уменьшить путем увеличения содержания в тесте белков и пентозанов, а также с помощью эмульгаторов (особенно моноацилглицеринов). Кроме того, черствение замедляется бактериальной α-амилазой, отщепляющей разветвленные олигосахариды от молекул амилопектина и тем самым предотвращающей образование кристаллических структур [38].

Литература

1. Cheftel J. C. Culioli J. Effects of high pressure on meat: A review // Meat Sci., 1997, 46(3), p. 211–236.
2. Huppertz T., Kelly A. L., Fox P. F. Effects of high pressure on constituents and properties of milk // Int. Dairy J., 2002, 12, p. 561–572.

3. Lakshmanan R., Piggott J. R., Paterson A. Potential applications of high pressure for improvement in salmon quality // Trends Food Sci. Technol., 2003, 14, p. 354–363.
4. Heertje I. Structure and function of food products: A review // Food Struct., 1993, 12, p. 343–364.
5. Lluch M. A., Hernando I., Perez-Munuera I. Lipids in food structures // Chemical and Functional Properties of Food Lipids / Z. E. Sikorski, A. Kolakowska (eds). — Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 2003. — P. 9–28.
6. Marion D., Dubreil L., Wilde P. J., Clark D. C. Lipids, lipid-protein interactions and the quality of baked cereal products // Interactions: The Keys to Cereal Quality / R. J. Hammer, R. C. Hoseney (eds). — St Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1998. — P. 131–158.
7. Bushuk W. Interactions in wheat doughs // Interactions: The Keys to Cereal Quality / R. J. Hammer, R. C. Hoseney (eds). — St Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1998. — P. 1–16.
8. Pokorny J., Kolakowska A. Lipid-protein and lipid-saccharide interactions // Chemical and Functional Properties of Food Lipids / Z. E. Sikorski, A. Kolakowska (eds). — Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 2003. — P. 345–462.
9. Jane J. Starch: Structure and properties // Chemical and Functional Properties of Food Saccharides / P. Tomasik (ed.). — Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 2004. — P. 81–101.
10. Lluch M. A., Perez-Munera I., Hernando I. Proteins in food structures // Chemical and Functional Properties of Food Proteins / Z. E. Sikorski (ed.). — Lancaster-Basel: Technomic Publ. Co., 2001. — P. 13–33.
11. Castillo G., Angeles Sanz M., Angeles Serrano M., Hernandez A. Influence of protein source, type, and concentration, and product form on the protein quality of commercial enteral formulas // J. Food Sci., 2002, 67, p. 328–334.
12. Biedermann-Brem S., Noti A., Grob K., Imhof D., Bazzacco D., Pfefferle A. How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking? // Eur. Food Res. Technol., 2003, 271, p. 185–194.
13. Pearce K. N., Friedman M. Binding of copper(II) and other metal ions by lysinoalanine and related compounds and its significance for food safety // J. Agric. Food Chem., 1988, 36, p. 707–717.
14. Friedman M., Pearce K. N. Copper(II) and cobalt(II) affinities of IX- and LD-lysinoalanine diastereomers: Implications for food safety and nutrition // J. Agric. Food Chem., 1989, 37, p. 123–127.
15. Wall J. S., Carpenter K. J. Variation in availability of niacin in grain products // Food Technol., 1988, 10, p. 198–204.
16. Chao H., Houston M. E., Hodges R. S., Kay C. M., Sykes B. D., Loewen M. C., Davies P. L., Sonnichsen F. D. A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice // Biochemistry, 1997, 36, p. 14652–14660.
17. Cheng A., Merz K. M. Ice-binding mechanism of winter flounder antifreeze proteins // Biophys. J., 1997, 73, p. 2851–2873.
18. Tomasik P. Saccharides // Chemical and Functional Properties of Food Components / Z. E. Sikorski (ed.). — 3rd ed. — Boca Raton: CRC Press, 2007. — P. 93–128.
19. MacDougall A. J., Ring S. G. Pectic polysaccharides // Chemical and Functional Properties of Food Saccharides / P. Tomasik (ed.). — Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 2004. — P. 181–195.
20. Ramsden L. Plant and algal gums and mucilages // Chemical and Functional Properties of Food Saccharides / P. Tomasik (ed.). — Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press, 2004. — P. 231–254.
21. Phillips G. O., Williams P. A. Interaction of hydrocolloids in food systems // Ingredient Interactions. Effect on Food Quality / A. G. Gaonkar (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1995. — P. 131–169.
22. Eliasson A. Ch. Lipid-carbohydrate interactions // Interactions: The Keys to Cereal Quality / R. J. Hammer, R. C. Hoseney (eds). — St Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1998. — P. 47–80.
23. Tolstoguzov V. Phase behavior of macromolecular components in biological and food systems // Nahrung, 2000, 44, p. 299–308.
24. Wilska-Jeszka J. Food Colorants // Chemical and Functional Properties of Food Components / Z. E. Sikorski (ed.). — 2nd ed. — Boca Raton: CRC Press, 2002. — P. 205–229.
25. Zagalsky P. F., Eliopaulos E. E., Findlay J. B. C. The architecture of invertebrate carotenoproteins // Comp. Biochem. Physiol., 1990, 97B, p. 1–18.
26. Romero C., Bakker J. Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanins composition and color in model solutions // J. Agric. Food Chem., 1999, 47, p. 3130–3139.
27. Reineccius T. A., Reineccius G. A., Peppard T. L. Utilization of β-cyclodextrin for improved flavor retention in thermally processed foods // J. Food Sci., 2004, 69, p. FCT58–FCT62.
28. Bakker J. Flavor interaction with the food matrix and their effects on perception // Ingredient Interactions. Effects on Food Quality / A. G. Gaonkar (ed.). — NY, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 1995. — P. 411–438.
29. Sekikawa M., Seno K., Shimada M., Fukushime M., Mikami M. Transaminase affects accumulation of free amino acids in electrically stimulated beef // J. Food Sci., 1999, 64, p. 384–386.
30. Kolodziejska I., Skonieczny S., Rubin L. Malondialdehyde-nitrite interactions in meat and model systems // J. Food Sci., 2000, 55, p. 925–928, 946.
31. Matsumoto J. J., Noguchi S. F. Cryostabilization of protein in surimi // Surimi Technology / T. C. Lanier, C. M. Lee (eds). — NY, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 1992. — P. 357–388.
32. Piotrowska B. Enzymatic and chemical modification of chitosan and gelatin and the properties of gelatin and chitozan/gelatin foils: PhD thesis / Faculty of Chemistry. — Gdansk University of Technology, 2004.

33. Fayle S. E., Gerrard J. A., Simmons L., Meade S. J., Reid E. A., Johnston A. C. Crosslinkage of proteins by dehydroascorbic acid and its degradation products // Food Chem., 2000, 70, p. 193–198.
34. Chiarello M. D., Larre C., Kedzior Z. M., Gueguen J. Pea seadling extracts catalyze protein amine binding and protein cross-linking. 2. Contribution of diamine oxidase for these reactions // J. Agric. Food Chem., 1996, 44, p. 3723–3726.
35. Wrigley C. W., Andrews J. L., Bekes F., Gras P. W., Gupta R. B., MacRitchie F., Skerritt J. H. Protein-protein interactions — essential to dough rheology // Interactions: The Keys to Cereal Quality / R. J. Hammer, R. C. Hoseney (eds). — St Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc., 1998. — P. 17–46.
36. Lefebvre J., Pruska-Kedzior A., Kedzior Z., Lavenant L. A phenomenological analysis of wheat gluten viscoelastic response in retardation and in dynamic experiments over a large time scale // J. Cereal Sci., 2003, 38, p. 257–267.
37. Friedman R. B. Interactions of starches in foods. Interaction of water with food components // Ingredient Interactions. Effects on Food Quality / A. G. Gaonkar (ed.). — NY, Basel, Hong Kong Marcel Dekker, 1995. — P. 171–195.
38. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. — Füenfte, vollstandig überarbeitete Auflage. — Berlin: Springer-Verlag, 2001.

15. СВОЙСТВА МОЛОКА

Харольд Э. Свейсгуд (*Harold E. Swaisgood*)
Перевод И. С. Горожанкиной под науч. ред. д-ра мед. наук С. А. Шевелёвой

Содержание

15.1. Введение ... 814
15.2. Биосинтез молока ... 814
15.3. Химический состав молока ... 817
15.3.1. Молочные белки ... 817
15.3.2. Липиды молока ... 819
15.3.3. Молочные соли и сахар ... 822
15.3.4. Ферменты ... 823
15.4. Структура компонентов молока ... 824
15.4.1. Структура молочных белков ... 824
15.4.1.1. Казеины ... 824
15.4.1.2. Сывороточные белки ... 826
15.4.2. Мицеллы казеина и соли молока ... 829
15.4.3. Жировые глобулы ... 831
15.5. Использование компонентов молока в качестве пищевых ингредиентов ... 831
15.5.1. Влияние технологии переработки молока на его компоненты ... 831
15.5.1.1. Жировая фаза ... 831
15.5.1.2. Белковые мицеллы и система солей молока ... 832
15.5.1.3. Сывороточные белки ... 834
15.5.1.4. Лактоза ... 834
15.5.2. Применение молочных ингредиентов в пищевых продуктах смешанного состава ... 835
15.5.2.1. Функциональные свойства белков ... 835
15.5.2.2. Казеины ... 836
15.5.2.3. Сывороточные белки ... 837
15.5.2.4. Лактоза ... 838
15.5.2.5. Функциональные свойства липидов молока ... 838
15.6. Питательные свойства молока ... 839
15.6.1. Состав нутриентов молока и молочных продуктов ... 839
15.6.2. Непереносимость лактозы ... 840
15.6.3. Влияние технологии переработки на пищевую ценность молочных продуктов ... 842
15.6.3.1. Влияние на белки ... 842
15.6.3.2. Влияние на витамины ... 842
15.7. Биоактивные пептиды из молочных белков ... 843
15.7.1. Производные казеинов ... 843
15.7.2. Производные сывороточных белков ... 844
Дополнительная литература ... 845
Литература ... 845

15.1. Введение

Для детенышей млекопитающих, в том числе человека, молоко является первой и, главное, единственной пищей, потребляемой в течение значительного периода времени. По мере одомашнивания животных молоко стало частью рациона и взрослых людей. Почти все молоко, перерабатываемое для потребления человеком, особенно в западных странах, — это молоко крупного рогатого скота (*Bos Taurus*). Основу молочной промышленности большинства стран, в том числе США, составляет преимущественно коровье молоко, и поэтому в данной главе мы будем рассматривать в основном свойства коровьего молока.

Данные об общем объеме производства молока и основных продуктов его переработки за 1970–2002 гг. приведены в табл. 15.1. Значительная часть молока-сырья (36–46%) перерабатывается на питьевое (жидкое) молоко, однако за эти 32 года структура потребления отдельных молочных продуктов существенно изменилась. В 1970 г. обычное цельное молоко составляло 78% от общей реализации питьевого молока, а маложирное — 12%, тогда как в 1992 г. простое цельное молоко в структуре потребления составляло 37%, маложирное — 46%, а обезжиренное — 12%. Более того, несмотря на то что количество употребляемого питьевого молока осталось относительно постоянным, его доля в общем объеме всех потребляемых молочных продуктов снизилась. Особенно заслуживает внимания тенденция к заметному росту потребления йогуртов.

Таблица 15.1

Производство молока и молочных продуктов в США в 1970–2002 гг. (по [74] и *USDA National Agricultural Statistics Service, Dairy Products 2002 Summary*)

Год	Молочные продукты с добавленной стоимостью*							
	Общее производство молока, млн т	Питьевое молоко**, млн т	Сыр, млн т	Йогурты, млн т	Сухое молоко, млн т	Консервированное молоко, млн т	Сливочное масло, млн т	Мороженое и др. замороженные десерты, млрд л
1970	53,1	24,0	1,5	0,08	0,69	0,58	0,52	4,0
1975	52,4	24,2	1,7	0,20	0,48	0,42	0,45	4,3
1980	58,4	24,1	2,3	0,27	0,57	0,33	0,52	4,3
1985	65,0	24,5	2,7	0,44	0,69	0,29	0,57	4,6
1990	67,4	24,9	3,1	0,47	0,48	0,27	0,59	4,5
2002	77,0	—	3,9	0,97	0,76	0,27	0,62	8,8

* С учетом всех видов сыров, кроме сыра коттедж.

** В том числе цельное, маложирное, обезжиренное и ароматизированное.

В последние 30 лет на американском рынке появились новые виды питьевого молока, в том числе УВТ-молоко в асептической упаковке. Этот продукт, соответствующий требованиям промышленной стерильности и реализуемый без охлаждения, в США большой популярности не завоевал, однако в других странах он занимает существенную долю рынка питьевого молока.

15.2. Биосинтез молока

По причине экономической важности молочных продуктов на раннем этапе изучения химии молока данный продукт, секретируемый молочной железой лактирующего скота, исследовался и описывался более тщательно, чем сама железа. Позднее вместе с достижениями в области молекулярной биологии и биологии клетки объектом интенсивных исследований стала собственно молочная железа. Хорошие обзоры по вопросам биосинтеза молока представлены в работах [32–35, 39, 48, 51]. Некоторыми высказывалось мнение, что по мере увеличения численности населения и усиления конкуренции за доступное зерно животноводство исчезнет, но ошибочность этого аргумента связана с существованием в пищеварительной системе коровы рубца (первого отдела желудка жвачных), который позволяет синтезировать питательные вещества из сырых целлюлозных и волокнистых растительных материалов и из простых форм азота (в том числе мочевины). Жвачные животные — это уникальные производители высококачественных пищевых продуктов даже из непригодных в других обстоятельствах исходных материалов.

Молочная железа коровы благодаря долголетней генетической селекции скота представляет собой очень продуктивный орган биосинтеза. В 1993 г. в США средняя продуктивность молочного стада в течение периода 305-дневной лактации составляла 7055 кг [2], но некоторые особо высокопродуктивные животные давали до 22 700 кг молока.

Строение коровьей молочной железы приведено на рис. 15.1.

Молоко, образующее в секреторной ткани вымени, собирается в протоках, которые по мере достижения области соска увеличиваются в размерах. Мельчайшим полностью укомплектованным «молочным заводом» с резервуаром для хранения является альвеола — микроорган примерно сферической формы, в центре которого находится резервуар для хранения (альвеолярная полость), окруженный монослоем секреторных эпителиальных клеток и связанный с системой протоков. Эти клетки ориентированы так, что их апикальная (верхняя) часть с уникальной мембраной граничит с альвеолярной полостью, а базаль-

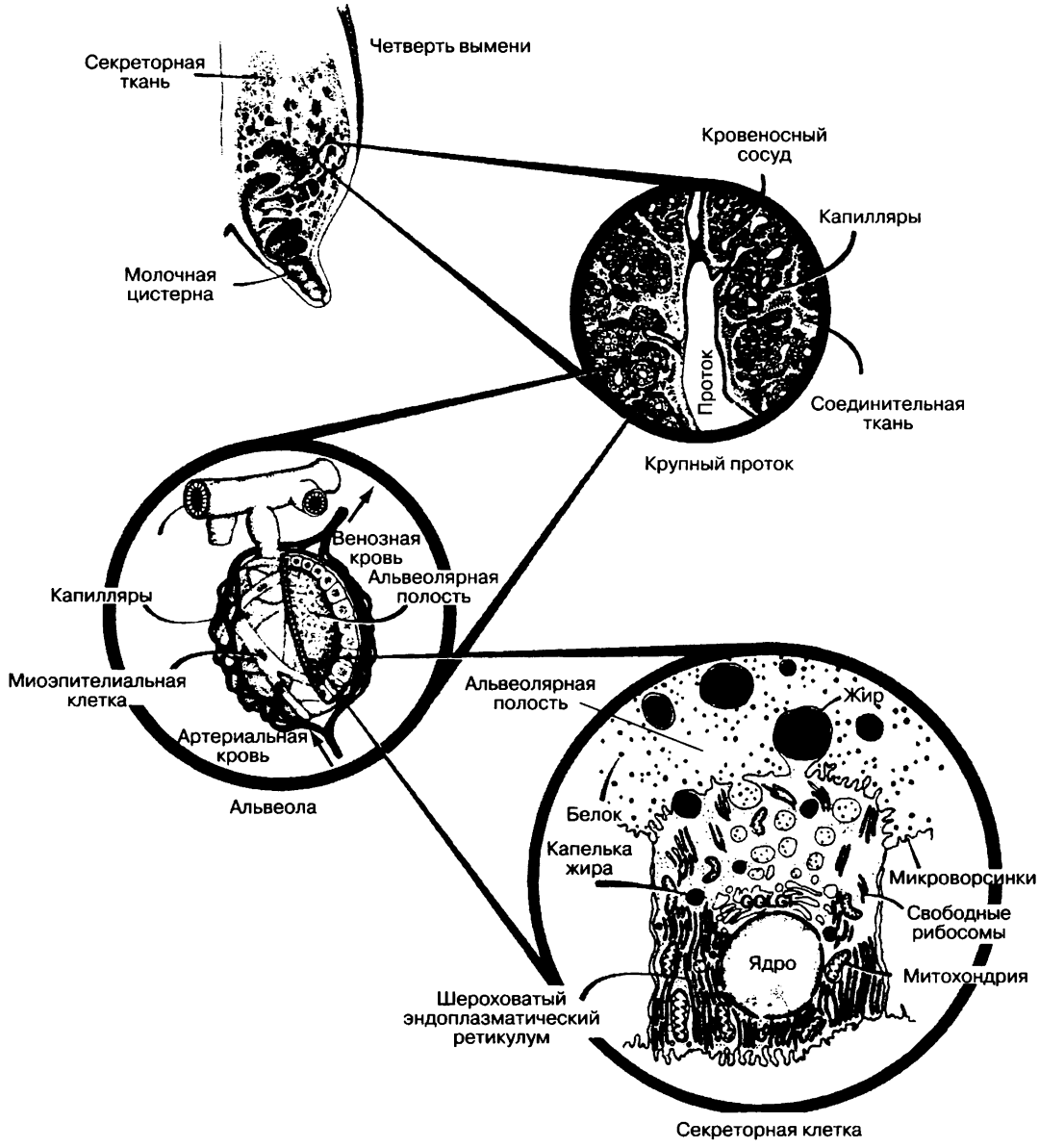


Рис. 15.1. Строение коровьей молочной железы и ее отдельных структурных элементов

ная (нижняя) часть отделена от крови и лимфы базальной мембраной. Благодаря этому через клетку осуществляется направленный ток метаболитов, причем структурные элементы молока поступают из крови через базолатеральную мембрану. Основные компоненты молока синтезируются на «производственных линиях» эндоплазматического ретикулума, причем этот процесс обеспечивается энергией посредством окислительного метаболизма в митохондриях. Синтезированные компоненты затем заключаются в секреторные пузырьки с участием аппарата Гольджи или находятся в виде капелек жира в цитоплазме. На заключительной стадии эти пузырьки и капельки жира проходят через апикальную плазматическую мембрану и хранятся в альвеолярной полости. Окружающий эту полость слой секреторных эпителиальных клеток покрыт слоем миоэпителиоцитов и кровяных капилляров. При поступлении циркулирующего в крови гормона гипофиза окситоцина последний связывается с миоэпителиальными клетками, альвеолы сокращаются, выталкивая хранящееся в альвеолярной полости молоко в систему протоков.

В настоящее время считается, что внутриклеточные мембраны (эндомембраны) В настоящее время" следующим образом: с конца первой строки также обеспечивают направленный поток к апикальной плазматической мембране (с одновременной трансформацией мембран из эндоплазматического ретикулума в Гольджи), к секреторным пузырькам, к апикальной плазматической мембране внутри эпителиальной секреторной клетки. Эндоплазматический ретикулум, своего рода эндоплазматическая «производственная линия», в которой происходит активный биосинтез, по-видимому, ведет себя как клеточная «система трубопроводов», при этом внутренняя полость этих трубок, называемая «молочной цистерной», опорожняется в аппарат Гольджи. Аппарат Гольджи трансформируется в пузырьки Гольджи — своего рода «упаковки», доставляющие компоненты водной фазы молока к апикальной плазматической мембране.

Рибосомы (аппарат для синтеза белка) существуют как в свободном виде (в цитоплазме), так и в связанной с эндоплазматическим ретикулумом форме. Эндоплазматический ретикулум, расположенный рядом с базальной мембраной, покрыт рибосомами, придающими этой мембране «шероховатый» вид. По мере продвижения к апикальной части аминокислотный пул истощается и синтез замедляется, что позволяет рибосомам диссоциировать, и к моменту трансформации этой мембраны в мембрану аппарата Гольджи она становится гладкой. Синтез завершается в полости аппарата Гольджи — белки гликозилируются и фосфорилируются, синтезируется лактоза. Именно в пузырьках аппарата Гольджи впервые появляются мицеллы казеина. Кроме того, эта мембрана непроницаема для лактозы, так что основные продукты клеточной секреции на данном этапе отделены от других клеточных компонентов.

Секреция продуктов синтеза завершается в том момент, когда пузырьки Гольджи сливаются с апикальной плазматической мембраной и растворяются, становясь частью этой мембраны, изливая содержимое «упаковки» в альвеолярную полость. При трансформации мембраны внутренняя поверхность мембраны пузырьков (со стороны полости) становится наружной поверхностью клеточной плазматической мембраны. Казеины, β-лактоглобулин и α-лактальбумин синтезируются в эпителиальных клетках молочной железы. Сывороточный альбумин и иммуноглобулины в этих клетках не синтезируются, но на базолатеральной мембране существуют специфические рецепторы для этих белков. Следовательно, эти белки транспортируются из крови в альвеолярную полость путем интернализации комплекса «белок–рецептор» и прохода через клетку в мембранных пузырьках.

Молочный жир, также синтезируемый эндоплазматическим ретикулумом, направляется к поверхности цитоплазматической мембраны, где он собирается в виде жировых капелек. Эти капельки перемещаются к апикальной плазматической мембране, где они вытесняются в альвеолярную полость посредством пиноцитоза, приобретая таким образом покрытие своей поверхности из плазматической мембраны. Наличие этой мембраны имеет большое значение для технологических свойств молочных продуктов. Утрачиваемая в этом процессе апикальная плазматическая мембрана постоянно обновляется (по крайней мере, частично) путем слияния с пузырьками (см. выше). Электролиты молока поступают из крови через каналы в базолатеральной мембране. Соотношение натрия и калия в молоке сходно с составом цитоплазмы. В то же время, поскольку молоко относительно плазмы крови является изоосмотической жидкостью и большая часть этой осмоляльности обеспечивается лактозой, концентрация электролитов в молоке ниже, чем в цитоплазме или в плазме крови.

Следует учитывать, что многие, если не все, свойства молока и его компонентов являются результатом действия механизма синтеза и секреции.

15.3. Химический состав молока

Благодаря своему специфическому составу молоко является единственным источником пищи для детенышей млекопитающих. Оно состоит из сложной смеси жиров, белков, углеводов, витаминов и минералов. Помимо них молоко содержит минорные компоненты, продуцентом которых является описанная выше сложная система клеточного синтеза. Усредненный состав молока по основным классам соединений и диапазон их содержания в молоке от западных пород КРС приведены в табл. 15.2.

Таблица 15.2
Состав коровьего молока от западных пород* КРС. По [12]

Компонент	Содержание, в среднем, %	Диапазон содержания, в среднем, %
Вода	86,6	85,4–87,7
Жир	4,1	3,4–5,1
Белок	3,6	3,3–3,9
Лактоза	5,0	4,9–5,0
Зола	0,7	0,68–0,74

* К западным породам относятся гернзейская, джерсейская, эрширская, коричневая швейцарская, шортгорнская и голштинская породы коров.

На состав молока влияет как рацион животного, так и порода. Наибольшую вариабельность демонстрирует липидная фракция. В прошлом селекционеры при отборе коров ориентировались на получение высокожирного молока из-за экономической ценности этого компонента. В настоящее время большее значение придается содержанию белка, и селекционеры начинают проводить отбор скота в целях обеспечения более высокого соотношения «белок/жир» и выработки белка.

Поскольку основной вклад в осмоляльность вносят лактоза и содержащиеся в молоке соли, а также из-за необходимости соответствия осмотического давления молока осмотическому давлению крови, в суммарном содержании лактозы и солей вариабельность очень невелика. Следует отметить, что показатель зольности на самом деле отражает не все соли, содержащиеся в молоке (органические соли при озолении разрушаются). Основными компонентами солевой системы молока являются различные соли лимонной кислоты. Значение pH свеженадоенного молока составляет 6,6–6,8, что несколько ниже, чем pH крови.

Значительная часть компонентов молока существует в растворе не в виде отдельных молекул, а представляет собой крупные и сложные ассоциации (табл. 15.3). Особенно это относится к казеинам, которые присутствуют в молоке в виде крупных сферических молекул (мицелл), и к липидам, образующим еще более крупные сферические глобулы. Благодаря их сферической форме и уменьшению фактического числа молекул (кинетических единиц) величины вязкости и осмотического давления в молоке гораздо меньше, чем в случае отсутствия подобных структур.

Таблица 15.3
Количество и размер основных компонентов молока

Компонент	Размер (диаметр) структурной единицы, нм	Количество в 1 мл
Лактоза	0,5	10^{19}
Сывороточный белок	4–6	10^{17}
Мицеллы казеина	30–300	10^{14}
Глобулы молочного жира	2000–6000	10^{10}

15.3.1. Молочные белки

В молоке содержится в среднем 30–39 г/л общего белка, обладающего высокими нутритивными свойствами. Молочные белки представлены двумя группами белковых фракций — казеинами и сывороточными белками. Существует шесть основных белковых продуктов молочной железы коровы: α_{S1}-казеин, α_{S2}-казеин, β-казеин, к-казеин, β-лактоглобулин и α-лактальбумин (табл. 15.4). Каждый из этих белков

Таблица 15.4
Состав белков молока

Белок	Содержание, г/л	Доля от общего белка в молоке, %
Казеины:	24–28	80
α_s-Казеины	15–19	42
α_{s1}	12–15	34
α_{s2}	3–4	8
β-Казеины	9–11	25
к-Казеины	3–4	9
γ-Казеины	1–2	4
Сывороточные белки:	5–7	20
β-Лактоглобулин	2–4	9
α-Лактальбумин	1–1,5	
Протеозо-пептонная фракция	0,6–1,8	4
Белки крови		
Сывороточный альбумин	0,1–0,4	1
Иммуноглобулины	0,6–1,0	2
Всего	30–39	100

проявляет генетический полиморфизм, так как они являются продуктами кодоминантных, аллельных и аутосомных генов. Как указывалось выше, все казеины существуют в виде уникального, высоко гидратированного сферического комплекса с фосфатом кальция, называемого казеиновой мицеллой. Размеры таких комплексов варьируют от 30 до 300 нм, причем некоторые мицеллярные комплексы иногда достигают размера в 600 нм.

Молочные белки легко разделяются на фракции казеина и сывороточных белков. Казеин составляет 80% всех белков коровьего молока. Соответственно, большая часть молочного белка аккумулируется в сгустке, образующемся в результате агломерации казеиновых мицелл при производстве сыра. Остальные белки переходят в подсырную сыворотку, и поэтому их называют сывороточными белками. Исторически основой производства большого числа молочных продуктов (сыра, изделий из сывороточных белков и других белковых ингредиентов) является отделение казеинов от остальных белков путем осаждения в их изоэлектрической точке (вблизи pH 4,6) с образованием так называемого «кислого казеина», а также путем агломерации казеиновых мицелл (сычужного свертывания, как в сыроделии), индуцированной действием ферментов. В прошлом сыворотка зачастую уходила в отходы, но в настоящее время разработаны экономически эффективные способы концентрирования или выделения сывороточных белков с высокими технологическими и функциональными свойствами.

Помимо β-лактоглобулина и α-лактальбумина, являющихся генетическими продуктами молочной железы, в сыворотке также содержатся сывороточный альбумин и иммуноглобулины, происходящие из крови. Кроме того, в молоке содержатся некоторые «белковые» компоненты, которые на самом деле представляют собой крупные полипептиды, являющиеся результатом посттрансляционного протеолиза молочных белков природной протеиназой молока — плазмином, также происходящим из крови. Таким образом, γ-казеины, которые фракционируются вместе с другими казеинами, и значительная часть протеозо-пептонной фракции сыворотки образуются в результате ограниченного протеолиза β-казеина.

Аминокислотный состав и ковалентные молекулярные массы основных молочных белков известны довольно точно благодаря анализу аминокислот и определению первичной структуры методом химического секвенирования (определения последовательности аминокислотных остатков), а также благодаря результатам генетического секвенирования (табл. 15.5). Характерной особенностью казеинов является очень высокое содержание в них остатков фосфосерина и довольно высокое содержание пролина. Если казеины довольно бедны цистеином, то в сывороточных белках содержится намного больше его остатков. Подробнее о свойствах отдельных молочных белков см. работы [8, 9, 26, 37, 38, 41–43, 59, 67–70, 72, 76, 77].

Таблица 15.5
Аминокислотный состав основных белков коровьего молока от западных пород. По [70]

Аминокислоты	Число аминокислот					
	α_{S1}-Казеин B-8P	α_{S2}-Казеин A-11P	к-Казеин B-1P	β-Казеин A^2-5P	β-Лактоглобулин A	α-Лактальбумин B
Неполярные						
Pro	17	10	20	35	8	2
Ala	9	8	15	5	14	3
Val	11	14	11	19	10	6
Met	5	4	2	6	4	1
Ile	11	11	13	10	10	8
Leu	17	13	8	22	22	13
Phe	8	6	4	9	4	4
Trp	2	2	1	1	2	4
Полярные, нейтральные						
Asn	8	14	8	5	5	12
Tre	5	15	14	9	8	7
Ser	8	6	12	11	7	7
Gln	14	16	14	20	9	5
Gly	9	2	2	5	3	6
Tyr	10	12	9	4	4	4
Цистин	0	1	1	0	2	4
Цистеин	0	0	0	0	1	0
PyrGlu	0	0	1	0	0	0
Полярные, кислые						
Asp	7	4	3	4	11	9
Ser P	8	11	1	5	0	0
Glu	25	24	12	19	16	8
Полярные, основные						
Lys	14	24	9	11	15	12
Gys	5	3	3	5	2	3
Arg	6	6	5	4	3	1
Всего аминокислотных остатков	**199**	**207**	**169**	**209**	**162**	**123**
Молекулярная масса	**23 614**	**25 230**	**19 006**	**23 988**	**18 363**	**14 174**

15.3.2. Липиды молока

В коровьем молоке содержатся наиболее сложные из известных липидов. Подробнее о свойствах различных липидов и их биосинтезе см. работы [3, 7, 27–29, 51]. Больше всего в молоке содержится триацилглицеринов (ТАГ), иногда называемых также триглицеридами (ТГ), которые составляют 96–98% общего содержания липидов (табл. 15.6). В молоке триацилглицерины присутствуют в виде глобул диаметром 2–6 мкм, окруженных мембранным материалом из апикальной клеточной мембраны. Их содержание, приведенное в табл. 15.6, характерно для свежего молока. В ходе хранения молока происходит небольшой липолиз, что приводит к увеличению содержания свободных жирных кислот, моно- и диацилглицеринов. В триацилглицеринах с тремя разными жирными кислотами в *sn*-2-позиции глицеринового каркаса присутствует хиральный атом углерода. Среди липидов коровего молока идентифицировано более 400 различных жирных кислот, то есть с учетом позиционных изомеров теоретически возможно существование 400^3 или 64 млн разновидностей ТАГ. Вместе с тем, лишь 13 жирных кислот присутствуют в концентрациях свыше 1% по массе (табл. 15.7), и максимальное число их изомеров составляет 13^3, то есть 2197.

Таблица 15.6
Липидный состав коровьего молока. По [28]

Липиды	Массовая доля	Содержание*, г/л
Триацилглицерины (триглицериды)	95,80	30,7
1,2-Диацилглицерины (диглицериды)	2,25	0,72
Моноацилглицерины (моноглицериды)	0,08	0,03
Свободные жирные кислоты	0,28	0,09
Фосфолипиды	1,11	0,36
Холестерин	0,46	0,15
Эфир холестерина	0,02	0,006
Углеводороды	Следы	Следы

* В промышленно выпускаемом пастеризованном цельном молоке жирностью 3,2%.

Таблица 15.7
Основные жирные кислоты молочного жира. По [28, 73]

Жирная кислота	Массовая доля, %	Жирная кислота	Массовая доля, %
$C_{4:0}$	3,8	$C_{16:0}$	43,7
$C_{6:0}$	2,4	$C_{18:0}$	11,3
$C_{8:0}$	1,4	$C_{14:1}$	1,6
$C_{10:0}$	3,5	$C_{16:1}$	2,6
$C_{12:0}$	4,6	$C_{18:1}$	11,3
$C_{14:0}$	12,8	$C_{18:2}$	1,5
$C_{15:0}$	1,1		

Если рассматривать только разные по составу жирные кислоты, а не их позиционные изомеры, то возможное число ТАГ с разным жирнокислотным составом составляет $n!/3!\,(n-1)!+n\,(n-1)+n$, где n — количество разных жирных кислот. При 13 разных жирных кислотах получается 455 ТАГ с разным составом жирных кислот. Методом ВЭЖХ с обращенными фазами выделены и идентифицированы 223 ТАГ с разным жирнокислотным составом, что составляет 80% от их общего числа [21]. Общая молярная доля каждого класса ТАГ и восьми их видов, присутствующих в наибольших количествах (в концентрациях свыше 2 моль%) приведены в табл. 15.8. Основную массу липидов (65 моль%) составляют насыщенные и мононенасыщенные ТАГ, причем восемь ТАГ, присутствующих в наибольших количествах, составляют около 25% их общего содержания.

Распределение жирных кислот в ТАГ не случайно, что обусловлено специфичностью участвующих в их синтезе ацилтрансферазных ферментов. Так, для ацилтрансферазы, специфичной для *sn*-1- и *sn*-2-положений, предпочтительным субстратом является высокомолекулярный ацилкофермент А. И наоборот, этерификация низкомолекулярными жирными кислотами происходит гораздо быстрее с участием фермента, специфичного для *sn*-3-положения. В результате преимущественно синтезируются ТАГ с одной низкомолекулярной и двумя средне- или высокомолекулярными жирными кислотами, тогда как простые или смешанные насыщенные высокомолекулярные ТАГ присутствуют в низких концентрациях. Эти факты подтверждаются данными, приведенными в табл. 15.9. Например, 85% бутирата и 58% капроата находятся в положении *sn*-3, тогда как в этом положении локализованы лишь 13% пальмитата и 16% стеарата.

Помимо высокой вариабельности по процентному содержанию молочные липиды и, в частности, жирные кислоты, наиболее подвержены изменениям под влиянием внешних факторов, например, состава кормов. Поскольку синтез низкомолекулярных жирных кислот и биогидрогенизация происходит в рубце, соотношение насыщенных жирных кислот к ненасыщенным существенно не меняется. Если ненасыщенные жирные кислоты потребляются животными в защищенной инкапсулированной форме с оболочкой из денатурированного белка, то они будут проходить через рубец без изменений, что приведет к более высокому содержанию ненасыщенных жирных кислот в ТАГ. Такое изменение состава ТАГ довольно привлекательно, особенно с учетом данных о полезности ненасыщенных жирных кислот для здоровья

Таблица 15.8

Жирнокислотный состав основных ТАГ молока. По [21]

Тип	Число атомов углерода	Жирные кислоты*	Моль%
Насыщенные ТАГ, всего**			32,4
	34	$C_{4:0}C_{14:0}C_{16:0}$	3,1
	36	$C_{4:0}C_{16:0}C_{16:0}$	3,2
	38	$C_{4:0}C_{16:0}C_{18:0}$	2,5
Мононенасыщенные ТАГ (всего)			32,6
	38	$C_{4:0}C_{16:0}C_{18:1}$	4,2
	40	$C_{6:0}C_{16:0}C_{18:1}$	2,0
	48	$C_{14:0}C_{16:0}C_{18:1}$	2,8
	50	$C_{16:0}C_{16:0}C_{18:1}$	2,3
	52	$C_{16:0}C_{18:0}C_{18:1}$	2,2
Диненасыщенные ТАГ (класс 011), всего***			10,6
Диненасыщенные ТАГ (класс 002), всего)***			2,5
Полиненасыщенные ТАГ (всех классов), всего***			5,2

*Нижним индексом обозначены длина углеродной цепи и число имеющихся двойных связей. Положение ацильных цепей в глицериновом каркасе не определялось.

** Приведено общее содержание (моль%) ТАГ данного типа. Приводимые разновидности соответствуют ТАГ, присутствующим в концентрациях более 2,0 моль%.

*** Класс 011 соответствует наличию у ТАГ двух мононенасыщенных жирных кислот, а класс 002 — наличию одной диненасыщенной жирной кислоты.

Примечание. В работе [21] было идентифицировано 80% ТАГ; триацилглицерины, содержащие жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода, количественному определению не поддавались.

Таблица 15.9

Позиционное распределение отдельных жирных кислот в триацилглицеринах коровьего молока. По [25, 28, 51, 53]

Жирная кислота	*sn*-Положение, моль%*		
	1	2	3
$C_{4:0}$	5,0 (10)	2,9 (5)	43,3 (85)
$C_{6:0}$	3,0 (16)	4,8 (26)	10,8 (58)
$C_{8:0}$	0,9 (17)	2,3 (42)	2,2 (41)
$C_{10:0}$	2,5 (21)	6,1 (50)	3,6 (29)
$C_{12:0}$	3,1 (25)	6,0 (47)	3,5 (28)
$C_{14:0}$	10,5 (27)	20,4 (54)	7,1 (19)
$C_{16:0}$	35.9 (45)	32,8 (42)	10,1 (13)
$C_{16:1}$	2,8 (48)	2,1 (36)	0,9 (16)
$C_{18:0}$	14,5 (58)	6,4 (26)	4,0 (16)
$C_{18:1}$	20,6 (42)	13,7 (28)	14,9 (30)
$C_{18:2}$	1,2 (28)	2,5 (60)	0,5 (12)

* Число в круглых скобках соответствует доле жирной кислоты в данной позиции.

человека, но степень их возможного влияния на стойкость липидов к окислению и, как следствие, на изменение вкуса и аромата до конца не ясна.

Фосфолипидная и холестериновая фракции молочных липидов находятся в мембранном материале, попадающем в молоко в процессе пиноцитоза жировых капелек в альвеолярную полость через плазматическую мембрану. Компоненты мембран глобулы молочного жира (МГМЖ, табл. 15.10), сходные с липидами клеточной плазматической мембраны, более чем на 20% состоят из фосфолипидов, при этом основными являются фосфатидилэтаноламин (22,3%), фосфатидилхолин (33,6%) и сфингомиелин (35,3%).

Из-за связи холестерина с возникновением атеросклероза содержанию этого стерина в пищевых продуктах уделяется большое внимание. В молоке содержится относительно небольшое количество холесте-

Таблица 15.10
Состав липидной фракции МГМЖ. По [71]

Компонент	Содержание мембранных липидов, %
Каротиноиды	0,45
Сквалены	0,61
Эфиры холестерина	0,79
Триацилглицерины*	53,41
Свободные жирные кислоты	6,30
Холестерин	5,20
Диацилглицерины	8,14
Моноацилглицерины	4,70
Фосфолипиды	20,40

* Содержат большую долю высокоплавких глицеридов с точкой плавления 52–53 °С.

рина — так, в стакане цельного молока его всего 27 мг (для сравнения, в одном крупном яйце содержится 275 мг холестерина, в 10 мелких креветках — 125 мг, а в 100 г пресноводной рыбы —70 мг). Поскольку холестерин содержится в мембране жировых глобул, его концентрация в молочных продуктах обусловлена их жирностью.

15.3.3. Молочные соли и сахар

Соли молока — это, прежде всего, хлориды, фосфаты, цитраты и бикарбонаты натрия, калия, кальция и магния [24, 54]. В молоке присутствуют как неорганические, так и органические соли, и их не следует путать с солями, образующими «зольный остаток» (оксиды минеральных веществ, образующиеся в результате сжигания). По размерам комплексов молочных солей они соответствуют диапазону от ультрафильтруемых форм (свободные ионы и ионные комплексы) до коллоидов (некоторые соли последнего типа участвуют в формировании структуры казеиновых мицелл, табл. 15.11).

Таблица 15.11
Содержание и размер молекул основных солей молока и лактозы. По [14, 14, 75]

Компонент	Общее содержание в молоке, мг/100 мл			
	В среднем	Дипазон	Доля ультрафильтруемых компонентов, %	Доля коллоидных компонентов, %
Соли кальция, всего	121	114–124	33	67
Ионы кальция	8	6–16	100	0
Соли магния	12,5	11,7–13,4	64	36
Цитраты	181	171–198	94	6
Фосфаты (неорганические)	65	53–72	55	45
Соли натрия	60	48–79	96	4
Соли калия	144	116–176	94	6
Хлориды	108	92–131	100	0
Лактоза	4800	4600–4900	100	0

Поддающиеся ультрафильтрации виды, которые находятся в равновесии с коллоидными формами, при диализе или ультрафильтрации (УФ) могут быть получены в составе пермеата. Анализ такого пермеата обеспечил базу для разработки рецептуры «имитированного ультрафильтрата молочных солей» [24], который обычно применяется для моделирования сывороточной фазы в исследованиях компонентов молока. Мультивалентные ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} существуют преимущественно в виде комплексов, в которые входят значительные количества цитратов кальция и магния и меньшее количество $Ca(H_2PO_4)_2$ [24]. Таким об-

разом, в виде свободных двухвалентных катионов присутствуют лишь 20–30% общего Ca и Mg в ультрафильтруемой форме — например, в молоке лишь 2–3 мМ свободного Ca^{2+}. Аналогично в виде комплексных ионов присутствует большая часть цитрата, а значительная часть фосфата существует в виде $H_2PO_4^-$ и HPO_4^{2-} Одновалентные ионы типа Na^+, K^+, и Cl^- практически полностью присутствуют в виде свободных ионов.

Коллоидные формы молочных солей связываются с молочными белками как в виде отдельных ионов, так и в виде комплексных структур казеиновых мицелл. Эти взаимодействия влияют на стабильность и функциональные свойства молочных белков, так что соли молока очень важны для общих свойств молочных продуктов.

Необходимое для биосинтеза условие одинаковой осмоляльности молока и крови обусловливает взаимодействие между солями молока и лактозой. Наличие обратной зависимости между содержанием натрия и лактозы, а также между содержанием натрия и калия документально подтверждено в работах [24, 54]. Молоко благодаря этому имеет практически постоянную точку замерзания (–0,53...–0,57 °C), и это коллигативное свойство используется для выявления фактов разбавления молока водой.

Преобладающим углеводом в коровьем молоке является лактоза (4-*O*-β-*D*-галактопиранозил-*D*-глюкопираноза), составляющая 50% СВ обезжиренного молока. Синтез лактозы связан с синтезом α-лактальбумина — основного сывороточного белка, действующего как белок-модификатор для УДФ-галактозилтрансферазы (УДФ — уридиндифосфат). Так, α-лактальбумин изменяет специфичность этого фермента таким образом, что галактозильная группа переносится скорее на глюкозу, чем на гликопротеины. Лактоза встречается в двух формах — α- и β-, и при 20 °C коэффициент равновесия β/α составляет 1,68 [49]. β-лактоза более растворима, чем α-форма, и скорость мутаротации при комнатной температуре высока, однако при 0 °C она очень низкая. Кристаллическая форма кристаллизуемого при обычных условиях α-гидрата встречается в разных конфигурациях, но наиболее известной является конфигурация «томагавка» — в этой конфигурации лактоза придает молочным подуктам, в частности, мороженому, ощущение песчанистости. Степень сладости лактозы составляет около 20% сладости сахарозы, и она содействует формированию молочного вкуса и запаха.

15.3.4. Ферменты

Несмотря на то что ферменты в молоке присутствуют в небольших количествах, они во многом влияют на стабильность молочных продуктов. Их эффекты становятся особенно важными, так как промышленность все более переходит на применение высокотемпературной и УВТ-переработки молока с получением продукции с длительными сроками хранения, в том числе при комнатной температуре. Эти условия хранения благоприятны для сохранения или реактивации ферментативной активности, а более длительный срок хранения предоставляет больше времени для протекания катализируемых ферментами реакций. Ниже мы рассмотрим лишь нативные ферменты молока, но следует учитывать, что некоторые ферменты привносятся в молоко в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Наиболее важные идентифицированные ферменты молока перечислены в табл. 15.12. Подробнее об этом см. работы [17, 30, 62].

Многие молочные ферменты первоначально связаны с мембранами (например, с мембраной глобул молочного жира), с мембранными везикулами обезжиренного молока или с мицеллами казеина. Например, ксантиноксидаза, сульфгидрилоксидаза и γ-глутамилтрансфераза связаны в основном с мембранными фракциями, плазмин и липаза — с казеиновыми мицеллами, а каталаза и супероксиддисмутаза встречаются преимущественно в молочной сыворотке. Вместе с тем на распределение ферментов между этими компонентами влияют условия переработки и хранения, способные существенно повлиять на их активность. Так, индуцированный холодом липолиз молока может вызываться перемещением липазы из мицелл к жировым глобулам, а холодильное хранение — провоцировать произвольное отделение протеиназы от казеиновых мицелл. Эти ферменты могут существенно влиять на вкус и запах, а также на стабильность белка в молочных продуктах. На стабильность вкуса и запаха влияют также оксидоредуктазы (путем окисления липидов).

Кроме того, в молоке содержится много витаминов, являющихся кофакторами ферментов или их предшественниками (об этом см. далее).

Таблица 15.12
Некоторые нативные ферменты коровьего молока (в круглых скобках приведено систематическое наименование). По [17, 30, 62]

Оксидоредуктазы	*Гидролазы*
Ксантиноксидаза (ксантин : O_2оксидоредуктаза)	Протеиназы (плазмин, тромбин, аминопептидаза и пептидилпептидгидролаза)
Сульфгидрилоксидаза (белок:пептид-SH:O_2оксидоредуктаза)	Липаза (гидролаза, катализирующая гидролиз эфиров глицерина)
Лактопероксидаза (донор : H_2O_2 оксидоредуктаза)	Лизоцим (мукопептид N-ацетилнейраминилгидролаза)
Супероксиддисмутаза (O^{-2} : O^{-2} оксидоредуктаза)	Щелочная фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты)
Глутатионпероксидаза (GSH : H_2O_2 оксидоредуктаза)*	АТФаза (АТФ-фосфогидролаза)
Каталаза (H_2O_2 : H_2O_2 оксидоредуктаза)	*N*-Ацетил-β-*D*-глюкозаминидаза
Диафораза (НАДН : липоамидоксидоредуктаза)	Холинэстераза (ацилхолинацилгидролаза)
Цитохром С редуктаза (НАДН:цитохром С оксидоредуктаза)	β-Эстераза (гидролаза карбоксиловых эфиров)
	α-Амилаза (α-1,4-глюкан-4-глюканогидролаза)
Лактатдегидрогеназа (*L*-лактат : НАД-оксидоредуктаза)	β-Амилаза (β-1,4-глюканмальтогидролаза)
Трансферазы	5'-Нуклеотидаза (5'-рибонуклеотидфосфогидролаза)
УДФ-галактозилтрансфераза (УДФ-галактоза : *D*-глюкоза-1-галактозилтрансфераза)	*Лиазы*
Рибонуклеаза (полирибонуклеотид 2-олигонуклеотидтрансфераза)	Альдолаза (фрукто-1,6-дифосфат-*D*-глицеральдегид-3-фосфатлиаза)
γ -Глутамилтрансфераза	Карбоновая ангидраза (гидролаза карбоновых эфиров)

* *GSH* — глутатион восстановленный. — *Примеч. пер.*

15.4. Структура компонентов молока

15.4.1. Структура молочных белков

По своей изученности молоко занимает уникальное положение среди пищевых продуктов благодаря тому, что установлена первичная структура всех основных молочных белков [8, 67–70, 76, 77]. Более того, известны также трехмерные структуры основных сывороточных белков, и хотя связь между структурой белков и их функциональными свойствами в пище еще не совсем ясна, в этой области отмечается значительный прогресс. При исследовании структуры пищевых белков ученым-пищевикам эту связь необходимо учитывать.

15.4.1.1. Казеины

Для казеинов характерно уникальное взаимодействие с ионами и солями кальция, что является важной особенностью их физиологической и нутритивной роли. Благодаря уникальной первичной и третичной структуре эти белки подвергаются посттрансляционному фосфорилированию. Такая модификация приводит к образованию в казеинах, «чувствительных к кальцию», анионных кластеров, тогда как в нечувствительном к кальцию к-казеине фосфорилируется единственный остаток. Чувствительные к кальцию казеины (α_{S1}-, α_{S2}- и β-казеины) называются так из-за их низкой растворимости в присутствии Ca^{2+}. Примеры первичной структуры этих анионных кластеров в чувствительных к кальцию казеинах приведены на рис. 15.2. Связывание Ca^{2+} в этих кластерах ведет к уменьшению заряда и дегидратации этой области, что изменяет баланс гидрофобных взаимодействий и электростатические силы отталкивания. Считается, что кластерные последовательности существуют в коротких экзонах, что делает возможным их дупликацию и быструю эволюцию в казеинах, чувствительных к кальцию [69, 70].

Белок	Заряд
α_{s1}-Казеин (*f* 61–70)	
Glu · Ala · Glu · SerP · He · SerP · SerP · SerP · Glu · Glu	–12
α_{S2}-Казеин (*f* 5–12); α_{S2}-казеин (*f* 56–63)	
Glu · His · Val · SerP · SerP · SerP · Glu · Glu	–9
SerP · SerP · SerP · Glu · Glu · SerP · Ala · Glu	–11
β-Казеин (*f* 14–21)	
Glu · SerP · Leu · SerP · SerP · SerP · Glu · Glu	–11

Рис. 15.2. Анионные кластеры чувствительных к кальцию казеинов

По всей вероятности, казеины, чувствительные к кальцию, развились под действием какого-то общего наследуемого гена, тогда как к-казеин — другого.

Казеинов в кристаллической форме не существует и, очевидно, не может быть, однако их первичные структуры обнаруживают еще одно уникальное свойство этих белков, а именно распределение полярных и гидрофобных остатков. Кластеризация полярных и гидрофобных остатков в отдельных областях первичной структуры приводит к образованию полярных и гидрофобных доменов и амфипатической структуры [67–70]. В растворах отдельного изолированного белка β- и к-казеины ассоциируются с образованием крупных сферических комплексов.

Полярные домены, чувствительные к кальцию казеинов, являются преобладающими за счет остатков фосфосерина, благодаря чему при нормальном значении pH молока они несут большой отрицательный заряд (см. рис. 15.2). Например, при pH 6,6 у полярного домена α_{S1}-казеина из 40 остатков (остатки с 41-го по 80-й) суммарный заряд составляет –20,6, что соответствует почти всему суммарному заряду молекулы (табл. 15.13). Сорок N-концевых остатков и сто *C*-концевых остатков, наоборот, являются гидрофобными. Хотя суммарный заряд всей молекулы α_{S2}-казеина меньше, чем у α_{S1}-казеина, в ней имеются несколько областей с очень высокой плотностью суммарного заряда (табл. 15.13, рис. 15.2). Таким образом, α_{S2}-казеины более гидрофильны, чем другие казеины, и содержат три области анионных кластеров. Гидрофобные области ограничены остатками 90–120 и 160–207 Более того, хотя *C*-концевая область является гидрофобной, у нее также большой суммарный положительный заряд (+9,5), тогда как у N-концевой области из 68 остатков суммарный заряд отрицательный (–21). Из-за этого этот белок очень чувствителен к ионной силе. С другой стороны, β-казеин является наиболее гидрофобным из всех казеинов. У этого белка небольшой N-концевой полярный домен из 21 остатка с суммарным зарядом –11,5 и единственный анионный кластер (см. табл. 15.13, рис. 15.2), а остальная часть молекулы довольно гидрофобна. Благодаря этому данная молекула является истинно амфифильной, причем полярный домен охватывает одну десятую часть всех остатков в цепи, но при pH 6,6 несет лишь треть суммарного заряда (суммарный заряд этого полярного домена почти равен заряду всей молекулы). Крупный гидрофобный домен делает β-казеин очень чувствительным к температуре.

Таблица 15.13
Заряд молочных белков. По [68–70]

Белок	Заряд при pH 6,6	Изоэлектрическая точка
α_{S1}-Казеин B-8P	–21,9	4,94
α_{S2}-Казеин A-11P	–13,8	5,37
β-Казеин A^2-5P	–13,3	5,14
к-Казеин B-1P	–2,0	5,90
β-Лактоглобулин B	–10,0	5,34
α-Лактальбумин B	–2,6	4,80

Примечание. В номенклатуре казеинов указывается генетический вариант и число остатков фосфосерина — например, α_{S1}-казеин B-8P означает генетический вариант с восемью остатками фосфосерина.

Нечувствительные к кальцию к-казеины также очень амфифильны с выраженными гидрофобными и полярными доменами, однако в полярном домене к-казеина нет анионного кластера. к-Казеин необ-

ходим для образования казеиновой мицеллы, и его структура обусловлена физиологическими функциональными ограничениями. Это, во-первых, необходимость взаимодействия с чувствительными к кальцию казеинами, которые образуют мицеллы, что стабилизирует чувствительные к кальцию белки в присутствии катионов Ca^{2+}; во-вторых, амфифильная структура с инертным полярным доменом, который не осаждается Ca^{2+}; и в-третьих, распознавание последовательности, специфичной для ограниченного протеолиза химозином, что позволяет высвободить полярный домен и осуществить коагуляцию мицелл. Вместо анионных фосфосериловых кластеров, характерных для чувствительных к кальцию казеинов, полярный домен к-казеина содержит остатки серина и треонина, которые зачастую оказываются гликозилированными. В результате этой посттрансляционной модификации к к-казеину прикрепляются три- или тетрасахаридные фрагменты, включающие анионные остатки N-ацетилнейраминовой кислоты (*AcNeu*) (рис. 15.3). В *С*-концевом полярном домене из 53 остатков отсутствуют катионные группы, и суммарный заряд негликозилированного домена при pH 6,6 составляет −11, тогда как к-казеин А-1Р (3 *AcNeu*), представляющий собой А-вариант с одним фосфосериловым остатком и тремя остатками *AcNeu*, имеет суммарный заряд −14. Поскольку к-казеин не содержит фосфосериловых анионных кластеров, он не связывает Ca^{2+} аналогично чувствительным к кальцию казеинам. Вместе с тем полярный домен включает много полярных аминокислот, имеет большой отрицательный заряд и восемь расположенных на равном удалении остатков пролина, образующих дегидратированную, открытую и гибкую структуру. Этот полярный домен примыкает к крупному очень гидрофобному домену со множеством сайтов, потенциально способных взаимодействовать с другими казеинами. Более того, пептид *Phe-Met*, связанный в позициях105–106 на N-конце полярного домена, очень чувствителен к протеолитическому расщеплению химозином (скорее всего из-за наличия выступающих с обеих сторон поверхности молекулы остатков пролина, что увеличивает гибкость цепи).

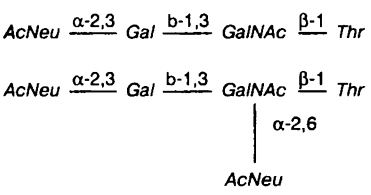


Рис. 15.3. Три- и тетрасахаридная структуры типичных углеводных фрагментов, прикрепляющихся к к-казеину

Хотя трехмерные структуры казеинов непосредственно не идентифицированы, предположения об общих аспектах их строения делают на основании их физико-химических характеристик и первичных структур. Спектральные свойства, включая круговой дихроизм и спектры Рамана, а также прогнозирование на основе первичных структур свидетельствуют, что у всех казеинов имеется довольно много участков со вторичной структурой [69, 70]. Предполагается и наличие «супервторичных» структур типа регулярно повторяющихся структурных элементов, таких как βαβ в гидрофобных доменах к-казеина, «поворот–β-цепь–поворот», сосредоточенном в *Phe-Met*-области к-казеина, и «спираль–петля–спираль» с петлей, содержащей анионные кластеры чувствительных к кальцию казеинов. Распространенные вторичные структуры могут также участвовать во взаимодействиях казеинов, что ведет к образованию субмицелл, однако эти структуры могу быть недостаточно стабильными и изменяться при изгибании казеиновых цепей в растворе. Кроме того, физико-химические свойства и протеолитическая чувствительность изолированных казеинов свидетельствуют о том, что их третичные структуры довольно открытые и гибкие. Причиной этой открытости и гибкости может быть преобладание остатков пролина, прерывающих вторичную структуру и способствующих образованию изгибов.

15.4.1.2. Сывороточные белки

Структуры β-лактоглобулина и α-лактальбумина типичны и для других глобулярных белков [5, 6, 22, 60]. Подобно казеинам, при pH молока они имеют суммарный отрицательный заряд (табл. 15.13), но в отличие от казеинов распределение последовательности расположения гидрофобных, полярных и заряженных остатков довольно равномерно. Соответственно, эти белки, завернутые внутримолекулярно, «прячут» таким образом значительную часть своих гидрофобных остатков, и обширной самоассоциации или взаимодействия с другими белками не происходит. Трехмерные структуры сывороточных белков были установлены методами рентгеновской кристаллографии (рис. 15.4 и 15.5).

В третичной структуре β-лактоглобулина содержится β-цилиндрическая структурная последовательность, подобная имеющейся у ретинолсвязывающих белков, и единственный короткий участок α-спирали на ее поверхности (рис. 15.4). Сердцевина β-цилиндра образует гидрофобный «карман» (такой «карман»

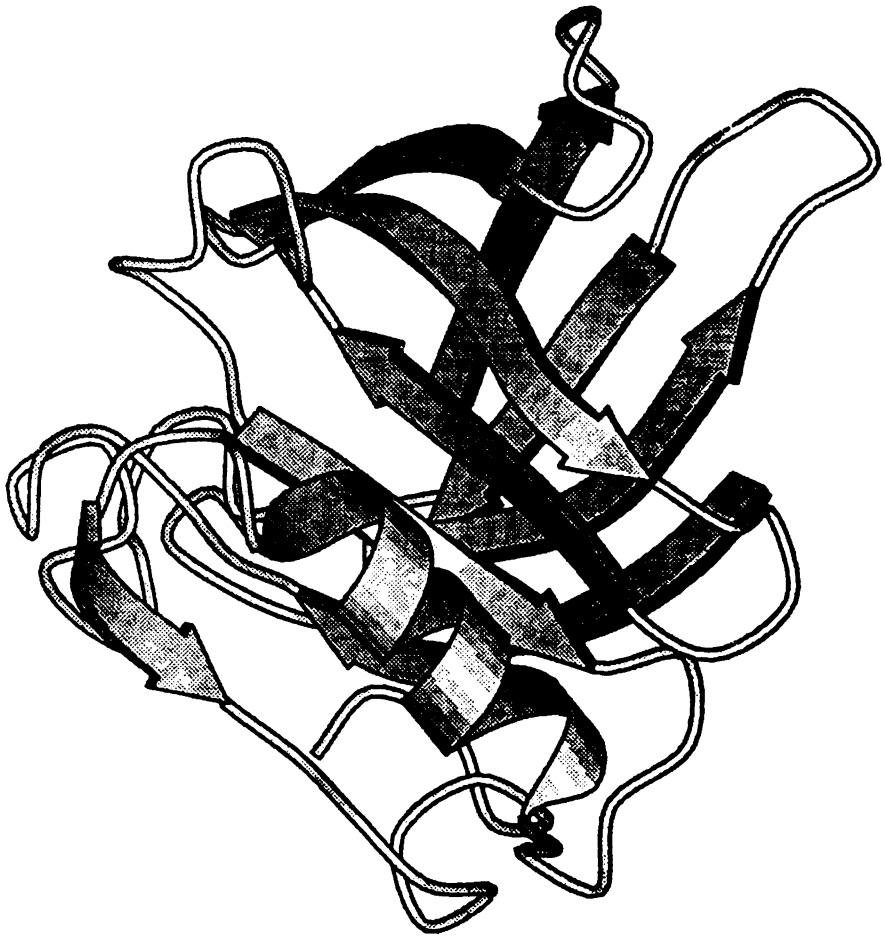


Рис. 15.4. Трехмерная структура β-лактоглобулина. Доступ к связывающей чашевидной полости находится вверху слева за верхним β-слоем (рисунок сделан с использованием программы *MOLESCRIPT* [31] и любезно предоставлен проф. Л. Сойрером) [31]

может быть и на поверхности между α-спиралью и β-цилиндром). В результате β-лактоглобулин связывает множество маленьких гидрофобных молекул с разным сродством.

Функциональные свойства β-лактоглобулина определяется этими гидрофобными карманами и поверхностными участками, а также, что еще более важно, присутствием дисульфидных связей и частично заглубленной сульфгидрильной группы. В соответствующих условиях этот белок легко участвует в сульфгидрил-дисульфидных реакциях обмена или реакциях с другими белками, например, с к-казеином.

Характер взаимодействий β-лактоглобулина зависит от значения pH. При pH молока он образует димеры, причем их геометрия напоминает две сталкивающиеся сферы; при pH 3,5 такой димер диссоциирует на слегка увеличенный в объеме мономер, при pH 3,5–5,2 димер полимеризуется с образованием октамера, а при pH выше 7 он диссоциирует с сопутствующим конформационным изменением и образованием увеличенного в объеме мономера.

Что касается структурной стабильности β-лактоглобулина, можно утверждать, что необратимые структурные изменения происходят в температурном диапазоне, используемом во многих технологиях термообработки молока и молочных продуктов, так что его функциональные свойства во многом зависят от точного контроля температурных режимов.

Трехмерная структура α-лактальбумина (рис. 15.5) очень напоминает структуру лизоцима [5, 6]. Это очень компактный глобулярный белок почти сферической формы, содержащий четыре α-спирали, несколько β-спиралей и антипараллельный β-слой. Недавнее обнаружение того факта, что α-лактальбумин

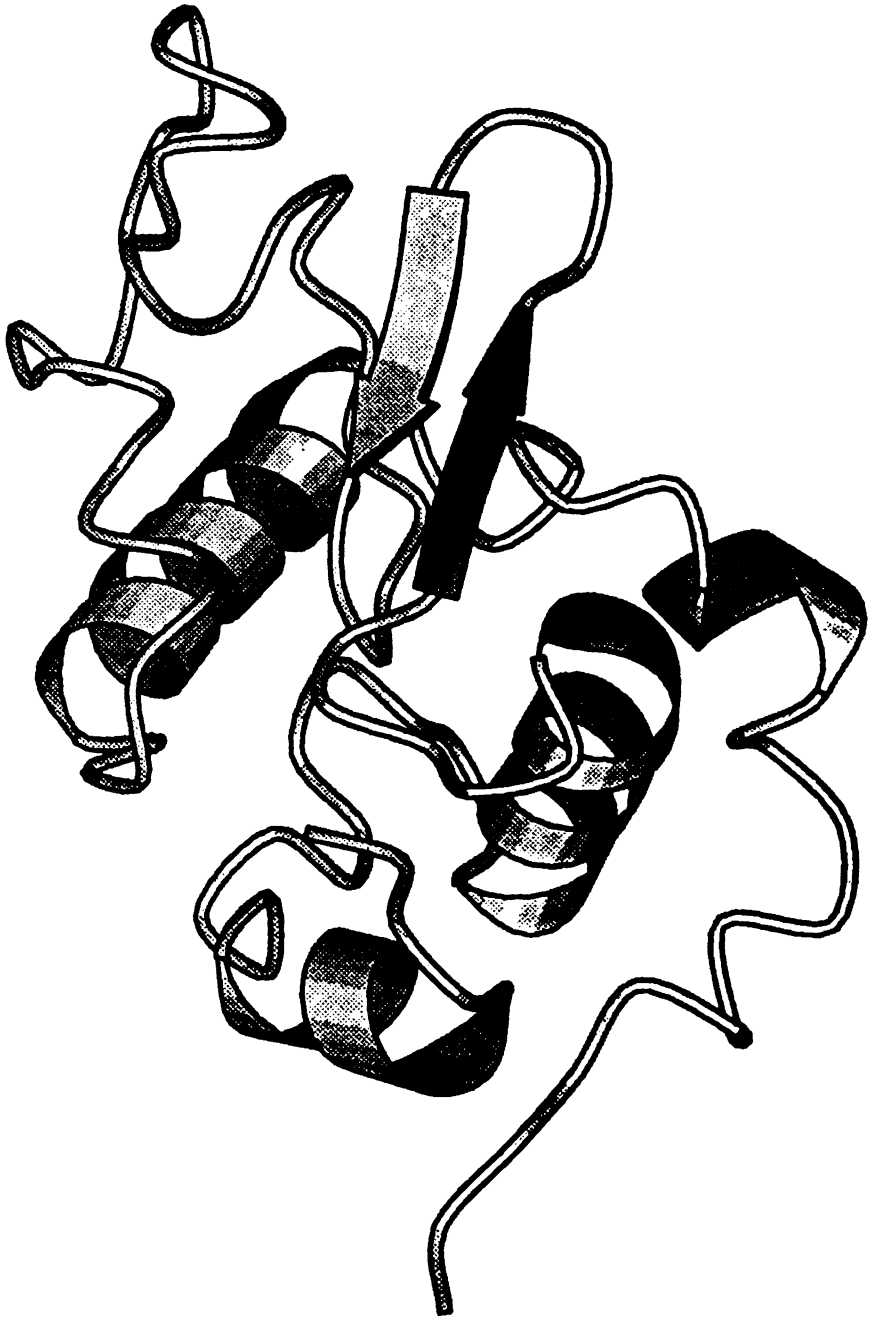


Рис. 15.5. Трехмерная структура α-лактальбумина (рисунок сделан с использованием программы *MOLESCRIPT* [31] и любезно предоставлен проф. Л. Сойрером) [31]. Использованные координаты получены из Брукхэвенского банка белка (*Brookhaven Protein Bank*) [4] и представляют кристаллическую структуру α-лактальбумина из молока обезьян (бабуинов)

является кальциевым металлопротеином, привело к выявлению самого необычного аспекта его структуры, а именно того, что одиночный катион Ca^{2+} связан с высоким сродством в «кальцийсвязывающем изгибе» из десяти остатков в последовательности «спираль–поворот–спираль» с координационными атомами кислорода, поступающими из карбоксильных групп боковых цепей Asp 82, 87 и 88 и пептидных карбонильных групп Lys 79 и Asp 84. Изучение «сворачиваемости» полипептидных цепей *in vitro* показало,

что восстановленный белок, который в окисленном состоянии содержит четыре дисульфидные связи, в отсутствие Ca^{2+} правильно не сворачивается. Кроме того, у голопротеина поверхностная гидрофобность меньше, чем у апопротеина, и поэтому считается, что связывание Ca^{2+} помогает сворачиванию молекулы белка *in vivo* и способствует высвобождению белка из эндоплазматического ретикулума.

В случае незатронутых дисульфидных связей молочного белка третичная структура развертывается и свертывается обратимо. Несмотря на то что α-лактальбумин денатурируется при более низкой температуре, чем β-лактоглобулин, этот переход обратим (за исключением случаев слишком высокой температуры). Таким образом, термическая денатурация α-лактальбумина (в отличие от β-лактоглобулина) в большинстве режимов термообработки молока обратима.

Известно, что физиологически α-лактальбумин действует как белок-модификатор галактозилтрансферазы, превращая ее в лактозосинтазу [5, 6]. Его роль в качестве модулятора K_M (константы Михаэлиса) осуществляется путем обратимого связывания с каталитическим доменом интегрального мембранного фермента галактозилтрансферазы, поступающей в полость аппарата Гольджи. В отсутствие α-лактальбумина этот фермент переносит галактозу от УДФ-галактозы для образования β-связи с 4-гидроксильной группой 3-связанного *N*-ацетилглюкозамина в *N*-связанных олигосахаридах гликопротеинов. После связывания с α-лактальбумином специфичность этого фермента по отношению к глюкозе возрастает в 1000 раз путем уменьшения K_M для этого субстрата. В результате при физиологических концентрациях глюкозы лактоза синтезируется в аппарате Гольджи.

15.4.2. Мицеллы казеина и соли молока

Благодаря своей амфифильной структуре и наличию фосфорильных групп казеины взаимодействуют друг с другом и с фосфатом кальция, образуя крупные сферические мицеллы разного размера, (90–300 нм, табл. 15.3). Рассеяние света именно этими комплексами и обусловливает белый цвет молока. Довольно большое количество данных свидетельствует, что эти мицеллы образуются в результате ассоциации почти сферических субмицелл размером 10–20 нм. По первым электронным микрофотографиям казеиновых мицелл полагали, что внешне они напоминает малину, однако более поздние снимки заставили в этом усомниться (рис. 15.6). Мицеллы содержат 92% белка с примерным молярным соотношением α_{S1}:α_{S2}:β:к-казеинов 3:1:3:1 и 8% солей молока, состоящих в основном из фосфата кальция и значительных количеств Mg^{2+} и цитрата. Именно характеристиками мицелл определяется поведение молока и молочных продуктов в процессе переработки и хранения; поэтому свойствам натуральных мицелл и модельным системам мицелл посвящено значительное количество исследований [13, 15, 52, 57, 61, 64–66].

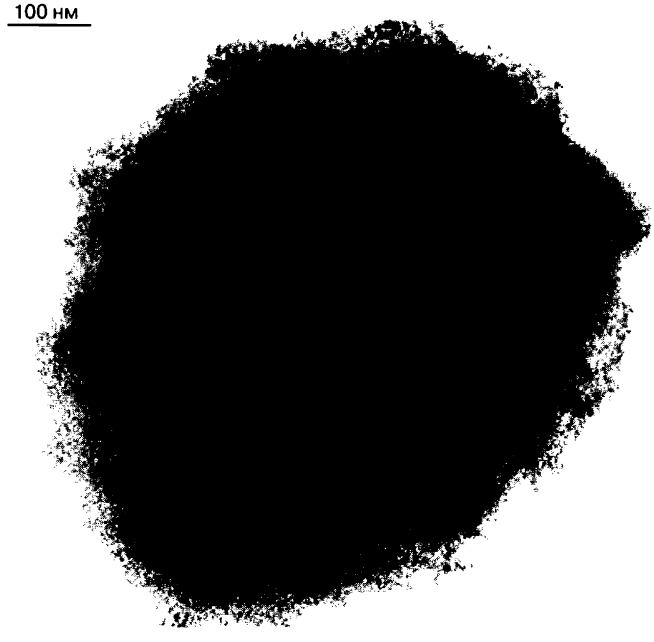


Рис. 15.6. Электронная микрофотография мицеллы казеина, любезно предоставленная проф. Д. Дж. МагМагоном (Университет штата Юта). Размер мерной планки 100 нм

Мицеллы имеют пористую, «губчатую» структуру, обладающую большим удельным объемом (примерно 4 $см^3$/г казеина) и очень высокую степень гидратации (на уровне 3,7 г H_2O/г казеина). Этот уровень гидратации выше значения, типичного для глобулярных белков, поэтому крупные молекулы, в том числе белки, имеют доступ ко всем частям структуры мицелл и могут находиться в состоянии равновесия с ними. Все компоненты мицеллы находятся в состоянии медленно развивающегося равновесия с молочной сывороткой. Тем самым в соответствующих условиях разные казеины и соли молока могут обратимо диссоциировать из мицеллы. Как ни

странно, такая диссоциация может происходить и без какого-либо очевидного изменения в размере мицеллы. Понижение температуры примерно до 0 °С заставляет некоторое количество β-казеина, κ-казеина и коллоидного фосфата кальция обратимо диссоциировать, однако при физиологической температуре количество отдельных казеинов или субмицелл в сыворотке является очень небольшим.

Поскольку структуру мицеллы непосредственно установить не удалось, не известна и точная локализация отдельных казеинов. Тем не менее, все данные свидетельствуют о преимущественно поверхностной локализации κ-казеина, тогда как α_S- и β-казеины в основном локализованы внутри мицеллы. Такое распределение, однако, не является единственно возможным, поскольку чувствительные к кальцию казеины доступны и на поверхности. По мере увеличения отношения поверхности к объему количество κ-казеина в мицелле линейно возрастает, а количество β-казеина линейно снижается (отношение поверхности сферы к объему с уменьшением диаметра возрастает). Поскольку компоненты сыворотки находятся в состоянии медленно развивающегося равновесия с мицеллой, добавление κ-казеина вызывает уменьшение размера мицеллы, а добавление β-казеина — его увеличение. Наблюдения в субмицеллярных моделях подтверждает непостоянный состав субмицелл, а также то, что субмицеллы, богатые чувствительными к кальцию казеинами, локализованы преимущественно внутри мицелл.

Основополагающей характеристикой мицелл является их устойчивость к необратимой ассоциации при тесном сближении; например, осадок, образующийся при отстаивании, при хранении спонтанно вновь диспергируется. Следовательно, поверхность мицеллы должна быть высоко сольватирована* и химически неактивна, что важно для ее стабильности в жестких условиях промышленной переработки молока.

Относительно недавно на поверхности мицелл был обнаружен «ворсистый» слой, который, как предполагается, является полярным доменом κ-казеина. Присутствие этой гибкой, высоко гидратированной полярной полипептидной цепи обеспечивает инертность поверхности и пространственную устойчивость мицеллы. Отщепление этого домена от κ-казеина химозином и высвобождение этого макропептида в молочную сыворотку полностью меняет поверхностные характеристики мицеллы, вызывая ее дестабилизацию. Модифицированная поверхность очень активна, что приводит к ассоциации мицелл и образованию гелей, подобных сырному сгустку.

Еще одним немаловажным компонентом для образования натуральных казеиновых мицелл является фосфат кальция [24, 57]. Хотя мицеллоподобные комплексы могут образовываться непосредственно с катионами Ca^{2+}, неорганический фосфат необходим для обеспечения термостойкости. Структура коллоидного фосфата кальция, состоящего из кальция, неорганического фосфата, магния и цитрата в определенных пропорциях, уже долго является предметом дебатов. Современные данные, полученные рентгеновской и инфракрасной спектрометрией, свидетельствуют, что его структура в мицеллах напоминает структуру брушита — кристаллической формы $CaHPO_4\ H_2O$ [24]. Фосфатные эфиры в анионных кластерах казеинов могут быть интегральной частью матрикса из фосфата кальция и Mg^{2+}-цитрата.

Для объяснения экспериментальных данных и стимуляции дальнейших исследований предложены различные модели структуры мицеллы. Их можно классифицировать как «модели покрытого ядра», «модели внутренней структуры» и «модели субъединиц» [15, 57]. Первая модель субъединицы предложена в работе [78] и была модифицирована в работах [61, 66, 79 и 80]. В настоящее время предпочтение отдается модели субъединиц, в которой субмицеллы имеют варьирующий состав. Основной силой, связывающей отдельные казеины в субмицелле, являются гидрофобные взаимодействия. Это может иметь место благодаря специфическим взаимодействиям между структурами β-слоев в гидрофобных доменах κ-казеинов и казеинов, чувствительных к кальцию. Гидрофобные взаимодействия не могут быть единственной силой, удерживающей субмицеллу, поскольку при низких температурах, когда такие взаимодействия значительно ослабляются, субмицеллы не диссоциируют. Неравномерное распределение κ-казеина в субмицеллах возможно за счет внутренних субмицелл с высоким содержанием казеинов, чувствительных к кальцию, и поверхностных субмицелл с высоким содержанием κ-казеина. Когда полярный домен κ-казеина, не способный взаимодействовать с фосфатом кальция, занимает достаточную площадь поверхности мицеллы, ее рост останавливается. Чем больше количество богатых κ-казеином субмицелл, тем тоньше мицеллы.

* «Сольватировать» — вступать в обратимую химическую комбинацию с растворителем или формировать более или менее прочно связанные комплексы между растворителем и растворенными веществами. — *Примеч. науч. ред.*

В этой модели субмицеллы взаимодействуют посредством встраивания анионных фосфосериловых кластеров в брушитоподобную структуру коллоидного фосфата кальция. Какое из взаимодействий между субмицеллами важнее — «белок–белок» или посредством солевых мостиков, до сих пор не ясно. Судя по всему, преобладающим является взаимодействие между субмицеллами посредством солевых мостиков, однако его относительная роль зависит от температуры.

В ходе исследований удалось обнаружить образование нанокластеров фосфата кальция при наличии полярного домена β-казеина — β-казеин (*f* 1–25) [15]. Эти нанокластеры самопроизвольно образуются *in vitro* — их масса 61 кДа, а свойства напоминают свойства мицеллярного фосфата кальция. В результате была предложена нанокластерная модель мицеллы, состоящей не из субъединиц, а из однородного белкового матрикса с нанокластерами фосфата кальция, произвольно распределенными по всей мицелле и стабилизированными лигандами, предоставленными полярными доменами казеинов, чувствительных к кальцию. Привлекательной особенностью этой модели является то, что она основана на известной биологической способности казеинов стабилизировать высокие концентрации солей кальция в молоке.

15.4.3. Жировые глобулы

Для снижения свободной поверхностной энергии липидов в водной среде молекулы липидов ассоциируются с образованием крупных сферических глобул, благодаря чему минимизируется поверхность раздела фаз. Самыми крупными частицами молока размером 2–6 мкм являются глобулы молочного жира (табл. 15.3). Рассеяние света этими крупными глобулами обусловливает «сливочный» цвет цельного молока. Средний диаметр жировых глобул молока примерно в 25 раз больше, чем у казеиновых мицелл. В процессе прохождения жировых глобул через плазматическую мембрану они приобретают покрытие, которое служит стабилизатором эмульсии типа «масло-в-воде» [40]. Такое мембранное покрытие содержит мембранные белки (в том числе ферменты), почти 70% фосфолипидов и 85% холестерина молока. Многие ферменты, обладающие важной для свойств молока активностью (щелочная фосфатаза, ксантиноксидаза, 5′-нуклеотидаза, сульфгидрилоксидаза и фосфодиэстераза) ассоциированы с мембранами глобул молочного жира.

Таким образом, глобула молочного жира включает липидное «ядро», состоящее из почти исключительно триацилглицеринов, небольшого слоя цитоплазматических белков, до момента секреции адсорбированных, и внешнего мембраноплазматического покрытия. По всей видимости, эта мембрана покрывает глобулу не полностью, так как на ее наружной поверхности обнаружены некоторые цитоплазматические белки.

Поскольку жировые глобулы имеют меньшую плотность, чем водная фаза молока, они всплывают, приводя к отстаиванию сливок в негомогенизированном молоке. Вместе с тем отстаивание происходит гораздо быстрее, чем это прогнозируется исходя из размера отдельных жировых глобул. Такая повышенная скорость образования сливок обусловлена кластеризацией глобул, вызванной взаимодействием мембранных белков с иммуноглобулином (*IgM*) и белком мембранных везикул обезжиренного молока. Крупные кластеры, как и предсказывает теория, всплывают гораздо быстрее, чем единичные глобулы.

15.5. Использование компонентов молока в качестве пищевых ингредиентов

15.5.1. Влияние технологии переработки молока на его компоненты

15.5.1.1. Жировая фаза

Молочный жир используется в трех основных формах: 1) гомогенизированной, как в цельном молоке, 2) концентрированной, как в сливках, получаемых путем центрифужной сепарации, и 3) изолированной, как в сливочном масле, получаемом сбиванием сливок. Жировой фазе молока и получаемым из нее пищевым продуктам посвящены прекрасные обзоры [7, 28]. Гомогенизация молока предотвращает образование слоя сливок из жировых глобул. Размер глобул при этом уменьшается с 3–10 мкм до менее чем 2 мкм путем продавливания жидкой жировой фазы через узкие отверстия под высоким давлением и с высокой скоростью. В результате снижения диаметра глобул общая площадь их поверхности возрастает в 5–10 раз

(с 2 до 10–20 м²/г). Образовавшая поверхность глобул характеризуется высокой свободной энергией поверхности раздела фаз и быстро адсорбирует белок под действием сил гидрофобного взаимодействия. Таким образом, на поверхности жировых глобул адсорбируются казеиновые мицеллы или субмицеллы и, в меньшей степени, сывороточные белки (около 10 мг/м²), причем эти вещества препятствуют слиянию (коалесценции) вновь образованных небольших глобул. В результате эти глобулы гомогенизированного жира по своим поверхностным свойствам несколько напоминают крупные казеиновые мицеллы. Так, любое действие, которое обычно приводит к агрегации мицелл (обработка химозином, сычужное свертывание в сыроделии, подкисление или чрезмерный нагрев) будет аналогичным образом приводить к агрегации этих вновь образованных жировых глобул. Именно поэтому кисломолочные продукты из гомогенизированного молока обладают иными реологическими свойствами по сравнению с аналогичными продуктами из негомогенизированного молока, а термостойкость гомогенизированных сливок меньше, чем негомогенизированных, из-за чего при добавлении к кофе они чаще образуют хлопья или капельки жира.

Основным преимуществом гомогенизации является предотвращение отстаивания сливок благодаря уменьшению размера жировых глобул и снижению склонности к их слиянию. Такая стойкость к коалесценции возникает из-за уже упоминавшейся адсорбции казеиновых мицелл, субмицелл и сывороточных белков к поверхности жировых глобул, денатурации иммуноглобулинов и разрушения мембранных везикул обезжиренного молока. Еще одним своего рода «выгодным» результатом гомогенизации является более белый цвет молока, получающийся из-за того, что большее количество и меньший размер жировых глобул более эффективно рассеивают свет.

Гомогенизация имеет также и некоторые недостатки, вдобавок к вышеупомянутой пониженной термостойкости гомогенизированных сливок по сравнению с негомогенизированными. Они выражаются в том, что у гомогенизированного молока более пресный вкус, жировые глобулы такого молока более чувствительны к индуцированному светом окислению и липолизу (если присутствует активная липаза), а сгусток белкового геля менее прочный.

Сливки получают центрифужной сепарацией холодного (температурой 5–10 °С) или теплого негомогенизированного молока. Холодное разделение менее разрушительно для мембран жировых глобул — в сливках благодаря этому содержится больше иммуноглобулинов, они более вязкие, чем сливки, получаемые при более высоких температурах. Сбивание сливок приводит к разрушению мембран жировых глобул и, в результате, к агрегации и коалесценции уязвимых глобул триацилглицеринов. Около 50% вещества мембран в процессе сбивания переходит в фазу пахты. Скопление и коалесценция только что «оголенных» жировых глобул происходит зачастую неправильно, когда жир либо весь твердый, либо весь жидкий, и поэтому температуру сбивания следует тщательно контролировать в целях обеспечения надлежащего соотношения твердого и жидкого жира. В процессе сбивания происходит инверсия эмульсии типа «масло-в-воде» в эмульсию типа «вода-в-масле», характерную для сливочного масла. В полученной устойчивой жировой фазе содержится некоторое количество неповрежденных жировых глобул (от 2 до 46% от общего жира) и около 16% мелкодисперсных вкраплений воды.

15.5.1.2. Белковые мицеллы и система солей молока

Технологические условия — изменение температуры, значения pH и концентрации — меняют равновесие в солевой и белковой системах молока, а также между солями и белками. Зачастую при восстановлении исходных условий эти изменения не полностью обратимы, так что свойства молочных продуктов во многом обусловлены режимами переработки молока.

Молочная сыворотка насыщена или перенасыщена фосфатом и цитратом кальция, и даже небольшие изменения условий внешней среды приводят к существенным сдвигам в этом равновесии [24]. Мицеллярный казеин гораздо менее стабилен, чем казеинат натрия. Как правило, изменения, снижающие удельный объем мицелл или повышающие содержание мицеллярного фосфата кальция, приводят к ухудшению стабильности. Так, казеиновые мицеллы становятся менее стабильными в присутствии спирта или с увеличением активности катионов Ca^{2+} Пастеризация (при 71,7 °С в течение 15 с) или УВТ-обработка (при 142–150 °С в течение 3–6 с) необратимо увеличивает количество коллоидного фосфата кальция за счет как растворенного и ионизированного кальция, так и растворенного фосфата. Соответственно, в резуль-

тате высвобождения протонов из первичных и вторичных фосфатов снижается и значение pH. Кальций, трансформируемый в фосфат кальция $Ca_3(PO_4)_2$, поступает не только из сыворотки, поскольку нагревание приводит также к диссоциации кальция, связанного с белком. Таким образом, пастеризация и особенно стерилизация изменяют распределение мицелл по размерам и обусловливают увеличение относительного содержания как крупных, так и мелких мицелл. Охлаждение до температуры 0–4 °C дает противоположный эффект, приводя к увеличению доли растворенных кальция и фосфата и к повышению значения pH. Как мы уже отмечали, при охлаждении из мицелл также диссоциирует некоторое количество β- и κ-казеина, однако эти индуцированные охлаждением изменения преимущественно обратимы.

Классифицируют отдельные типы молока соответственно их pH-зависимой термостабильности (продолжительности нагревания, требуемой для коагуляции белка) [63]. У молока типа *A* оптимум на кривой стабильности лежит в диапазоне pH 6,6–6,9, а стабильность молока типа *B* повышается при увеличении значения pH выше pH 6,6. Это явление, по-видимому, связано с соотношением β-лактоглобулина и κ-казеина, а также взаимодействиями между этими белками, индуцированными нагреванием. Добавление κ-казеина превращает молоко типа *A* в тип *B*, а обратный эффект обеспечивается добавлением к молоку типа *B* β-лактоглобулина.

Пастеризация или УВТ-обработка молока приводит к частично необратимому развертыванию молекул β-лактоглобулина. При этом «обнажаются» гидрофобная поверхность и одиночные сульфгидрильные группы. Последующее взаимодействие с κ-казеином, стабилизируемое за счет взаимообмена сульфгидрильных и дисульфидных групп, меняет поверхностные свойства казеиновой мицеллы. Предварительное кипячение несгущенного молока при температуре 90 °C в течение 10 мин снижает его стойкость к последующей обработке при более высоких температурах, а такая же обработка сгущенного молока почти удваивает способность мицелл не поддаваться коагуляции при последующей обработке при более высокой температуре. Сгущение молока снижает значение pH и повышает как активность Ca^{2+}, так и концентрацию коллоидного фосфата кальция, из-за чего снижается стабильность мицелл. В сгущенном молоке дестабилизирующий эффект взаимодействия мицелл с денатурированным β-лактоглобулином вполне компенсируется снижением термически индуцированной активности катионов Ca^{2+} Таким образом, сгущенное молоко нельзя стерилизовать без предварительной тепловой обработки.

Более жесткие режимы термообработки сопровождаются повышенным выделением остатков дегидроаланина (вследствие β-элиминирования дисульфидных связей и остатков фосфосерина (см. главу 5), повышенным дезаминированием остатков аспарагина и глютамина, а также увеличением неферментативного потемнения (реакции Майяра). Поперечная сшивка белков при нагревании может быть обусловлена реакцией остатков дегидроаланина с ε-аминогруппами остатков лизина с образованием лизиноаланина или реакцией остатков цистеина с сульфгидрильными группами с образованием лантионина. Продолжительное кипячение (например, в течение 20–40 мин при температуре 140 °C) дестабилизирует мицеллы, приводя к образованию геля. Эта дестабилизация мицелл обусловлена действием нескольких факторов, наиболее важным из которых является снижение значения pH. Причинами этого снижения является расщепление лактозы, сдвиг в состоянии равновесия от первичных и вторичных фосфатов к гидроксиапатиту — $Ca_5(PO_4)_3OH$, а также гидролиз фосфосерина [19]. Сдвиг равновесия у фосфатов кальция происходит очень быстро, и значение pH снижается примерно с 6,7 до 5,5. Расщепление лактозы и гидролиз фосфосерина происходят медленнее (расчетное значение pH в точке коагуляции молока 4,9). Образующийся при нагревании коллоидный фосфат кальция не является брушитоподобным «фосфатом кальция–цитратом магния», присутствующим в натуральных мицеллах, и поэтому это изменение в солевом равновесии, как правило, необратимо. Следует отметить, что при pH 4,9 нативный коллоидный фосфат кальция обычно бывает полностью растворен, а высокие температуры (140 °C) и снижение значения pH приводят к диссоциации мицелл. Таким образом, получающийся коагулят, по всей видимости, состоит не из целых мицелл, как в сырном сгустке, а из матрикса взаимодействующих отдельных белковых цепей или субмицелл. Свой вклад в стабильность таких межбелковых взаимодействий могут вносить также сульфгидрильно-дисульфидный обмен и ковалентные поперечные сшивки.

Добавление к молоку солей, кислот или щелочей влияет на активность Ca^{2+} и, следовательно, на равновесие фосфатов кальция, меняя связывание Ca^{2+} и коллоидного фосфата кальция с мицеллой, и, соответственно ее стабильность. Так, добавление вторичного фосфата стабилизирует мицеллярную систему пу-

тем увеличения значения pH и суммарного заряда мицеллы, путем снижения концентрации растворимого кальция из-за сдвига равновесия в сторону третичного фосфата кальция, а также путем конкурентного замещения мицеллярного кальция на натрий. Следовательно, эту соль можно применять как стабилизатор молока. Аналогичным образом, прекрасными молочными стабилизаторами могут быть поливалентные анионы (цитрат или полифосфаты), которые связывают и увеличивают суммарный мицеллярный заряд и снижают содержание растворимого кальция. И наоборот, добавление солей кальция повышает активность Ca^{2+} и, следовательно, содержание коллоидного фосфата кальция, что приводит к получению более низкого значения pH и менее стабильных мицелл. Как мы уже отмечали, такой же эффект оказывает сгущение молока, поскольку солевое равновесие сдвигается в сторону коллоидного фосфата кальция, а значение pH снижается. Например, 11-кратное сгущение молока увеличивает концентрацию растворенного кальция и фосфата лишь в восемь раз, а концентрацию Ca^{2+} — только в 6 раз, тогда как pH снижается с 6,7 до 5,9.

Все это следует учитывать при переработке молока и при его использовании в пищевых продуктах смешанного состава. Из-за нестабильности мицелл в сгущенном молоке перед сгущением в молоко обычно добавляют стабилизаторы. Кроме того, перед сгущением или сушкой молоко предварительно нагревают, чтобы обеспечить сдвиг равновесия фосфатов кальция (и уменьшть тем самым активность Ca^{2+}) и стимулировать взаимодействие мицелл с денатурированным β-лактоглобулином. Улучшить характеристики свертывания сгустка можно путем добавления солей кальция.

15.5.1.3. Сывороточные белки

Поскольку при температурах выше 70 °C быстро происходит денатурация сывороточных белков, при стандартной промышленной термообработке молока часть этих белков денатурируется. По термостойкости основные сывороточные белки можно расположить в следующем порядке: α-лактальбумин < альбумин < иммуноглобулин < β-лактоглобулин. Термическое развертывание молекулы α-лактальбумина является обратимым, так что денатурация белков, определяемая по необратимым изменениям, свидетельствует о следующем порядке повышения термостойкости: иммуноглобулин *G* < сывороточный альбумин < β-лактоглобулин < α-лактальбумин. Денатурированные сывороточные белки, особенно β-лактоглобулин, намного менее растворимы и больше осаждаются ионами кальция, чем их нативные прототипы. В результате денатурированные сывороточные белки частично попадают в сырный сгусток, но его формированию мешает катализируемое химозином связывание β-лактоглобулина с мицеллярным к-казеином. Из-за этого режимы производства сыра следует тщательно подбирать.

Как мы уже отмечали, индуцированная нагреванием ассоциация сывороточных белков (особенно β-лактоглобулина) с казеиновыми мицеллами меняет свойства мицелл и повышает их термостойкость. Технологические свойства сывороточных белков во многом зависят от степени денатурации. Например, если сывороточные белки не подвергались тепловой денатурации, они довольно хорошо растворимы при кислых значениях pH, и это их свойство облегчает их применение в газированных напитках. Весьма важна также степень их денатурации, которую следует тщательно контролировать для оптимизации эффективности сывороточных белков как имитаторов жира.

15.5.1.4. Лактоза

Взаимодействие альдегидной группы лактозы с ε-аминогруппой лизина (начальный этап реакций Майяра) происходит даже при очень мягкой термообработке, продолжаясь в ходе хранения. Развитие реакций Майяра с соответствующим потемнением во многом зависит от степени жесткости тепловой обработки, причем возникающие эффекты в одних продуктах желательны, а в других — нет. Очень жесткие режимы тепловой обработки (например, используемые для стерилизации сгущенного молока в банках) вызывают посредством реакций Майяра частичное расщепление лактозы с образованием органических кислот (главным образом, муравьиной). Одной из главных причин дестабилизации белка в таких продуктах является именно этот источник закисления.

Очень низкая растворимость α-аномера лактозы приводит к ее кристаллизации в замороженных продуктах. Кристаллизация α-лактозы в замороженном молоке обычно сопровождается быстрой дестабилизацией и осаждением казеина, но причины этого до конца не ясны. Растворенная лактоза может оказывать на казеин непосредственное стабилизирующее влияние, а при кристаллизации лактозы этот эффект

пропадает. На стабильность казеина кристаллизация лактозы может влиять и косвенно, поскольку ее удаление из жидкой фазы снижает концентрацию растворенных веществ, обусловливая дополнительное образование льда. Такой эффект подобен наблюдаемому при сгущении молока — концентрация ионов кальция в жидкой фазе возрастает, осаждается больше третичного фосфата кальция, а это приводит к снижению значения pH и к нестабильности казеина.

Причиной такого распространенного дефекта мороженого, как «песчанистость», является образование крупных кристаллов α-лактозы. Данный дефект почти полностью устраняется путем внесения стабилизаторов растительного происхождения, препятствующих образованию ядер (центров) кристаллизации лактозы.

15.5.2. Применение молочных ингредиентов в пищевых продуктах смешанного состава

15.5.2.1. Функциональные свойства белков

В настоящее время в пищевых продуктах все чаще в качестве ингредиентов используются белки из традиционных источников. Преимущества использования молочных белков как ингредиентов других продуктов объясняются их высокими нутритивными свойствами и способностью придавать продуктам уникальные и жизненно необходимые функциональные свойства [16, 44, 45, 47]. Функциональные свойства пищевого белка, очевидно, связаны с его структурой, но в настоящее время эти связи еще изучены не настолько, чтобы конструировать структуру белка для достижения требуемых функциональных свойств. Тем не менее, можно наметить некоторые общие взаимосвязи между структурой и функциональными свойствами белков.

Функциональные свойства белков обусловлены некоторыми общими свойствами их молекул — способностью к гидратации, поверхностной активностью и типом межбелковых взаимодействий в частично развернутых структурах. Функциональные свойства белков, обусловливаемые их молекулярными свойствами, приведены в табл. 15.14. Особенно важным свойством является способность к гидратации, поскольку растворимость является необходимым условием для проявления многих важных функциональных свойств, а во многих пищевых продуктах необходимо связывание воды. Поверхностная активность — это комплексная функция гидрофобности поверхности молекулы белка и ее трансформируемости, позволяющей молекуле развертываться и распределяться по поверхности раздела фаз. Порядок убывания поверхностной активности различных белковых компонентов молока можно представить следующим образом: β-казеин > монодисперсные казеиновые мицеллы > сывороточный альбумин > α-лактальбумин > α_s-казеин–к-казеин > β-лактоглобулин [47].

Для функциональности белков очень важны межмолекулярные взаимодействия между частично развернутыми белковыми структурами, но они являются комплексной функцией стабильности и структуры белка, а также типа поверхности и ее структуры, доступной в частично развернутом белке. Казеины в этом отношении уникальны, так как их гибкая структура позволяет взаимодействовать со многими частично развернутыми структурами других белков путем гидрофобных взаимодействий и/или удлинения вторичной структуры.

Таблица 15.14

Взаимосвязь между молекулярными свойствами белка и его функциональностью. По [45]

Свойства молекул белков	Соответствующие функциональные свойства
Способность к гидратации	Растворимость, диспергируемость, набухание, вязкость, гелеобразование, поглощение воды
Поверхностная активность	Эмульгирование, адсорбция жира, пенообразование, взбиваемость
Способность к межбелковым взаимодействиям	Агрегация, сцепление, текстуризация, гелеобразование, вязкоупругие свойства, экструдируемость
Структура и строение, обусловливающие органолептические свойства	Цвет, вкус и запах

Термически развернутые структуры белков представляют собой, по-видимому, своего рода «расплавленные глобулы», не имеющие третичной, но обладающие вторичной структурой.

Достижения в биотехнологии вызвали интерес к конструированию функциональных свойств белков для конкретных областей их применения путем генетической или ферментной модификации. Потенциально функциональные свойства белка можно изменить и, возможно, сконструировать, путем специфического ограниченного протеолиза. Известно, что именно это и происходит при свертывании молока химозином. При этом для оптимизации желаемых свойств и предотвращения появления посторонних вкуса и запаха важно тщательно контролировать ход такой реакции (контроль над этой реакцией легче всего осуществлять в биореакторах с иммобилизованными ферментами).

Поскольку для новорожденных млекопитающих молочные белки являются основным источником пластических материалов, можно гарантировать их отличные нутритивные и вкусовые свойства, а также отсутствие антинутритивных факторов.

15.5.2.2. Казеины

Казеины обладают очень высокой растворимостью, а при pH выше 6 — и термостойкостью. Кроме того, эти белки благодаря их амфифильной структуре обладают высокой эмульгирующей способностью. Состав некоторых промышленно выпускаемых казеиновых и сывороточных белковых продуктов приведен в табл. 15.15, а типы продукции, где казеин используется как белковый ингредиент, — в табл. 15.16. Функциональные свойства промышленно выпускаемых белковых продуктов зависят от типа продукции, так что тщательный анализ технических требований к ингредиенту должен быть частью процесса их подбора. Существуют четыре типа коммерческих казеинов: кислотный казеин, сычужный казеин, казеинат и копреципитат. Ежегодно в мире производится около 250 000 т казеинов.

Кислотные казеины (солянокислые, молочнокислые и сернокислые) являются просто изоэлектрическими преципитатами (pH 4,6), они не очень хорошо растворимы. Сычужный казеин, производство которого основано на обработке химозином (сычужным ферментом), тоже не слишком растворим, особенно в присутствии Ca^{2+}, так как у него отщеплен полярный домен к-казеина. В сычужном казеине высоко содержание минеральных веществ, так как коллоидный «фосфат-цитрат кальция» включен в состав свернутых мицелл, а в кислом казеине содержание минеральных веществ ниже, поскольку фосфат кальция растворяется и переходит в сыворотку. Копреципитаты казеина и денатурированные сывороточные белки более растворимы, чем кислотный или сычужный казеин, но менее растворимы, чем казеинаты. Растворение копреципитатов достигается путем обеспечения щелочного значения pH и добавлением полифосфатов. Благодаря своей низкой растворимости эти препараты лучше подходят для продуктов типа

Таблица 15.15

Состав некоторых промышленно выпускаемых казеиновых и сывороточных белковых препаратов. По [45, 46]

Белковые препараты	Состав, % на сухую массу			
	Белок	Зола	Лактоза	Жир
Казеиновые продукты:				
казеинат натрия	94	4,0	0,2	1,5
кислотный казеин	95	2,2	0,2	1,5
сычужный казеин	89	7,5		1,5
копреципитат	89–94	4,5	1,5	1,5
Концентраты сывороточного белка:				
нормальный УФ-КСБ	59,5	4,2	28,2	5,1
нейтральный УФ/ДФ-КСБ	80,1	2,6	5,9	7,1
Изоляты сывороточного белка:				
ИСБ «Сферозил *QMA*»	77,1	1,8	4,6	0,9
ИСБ «Сферозил *S*»	96,4	1,8	0,1	0,9
«Вистек»	92,1	3,6	0,4	1,3

Таблица 15.16
Некоторые области применения промышленно выпускаемых молочных белков в пищевых продуктах смешанного состава. По [47]

Категория пищевых продуктов	Конкретные продукты с использованием казеинов	Конкретные продукты с использованием сывороточных белков
Хлебобулочные и мучные кондитерские изделия	Хлеб, печенье и крекеры, зерновые завтраки, пекарские порошки, кексы и пирожные, замороженное тесто, кондитерские глазури	Хлебобулочные и мучные кондитерские изделия — хлеб, кексы, круассаны и др.
Продукты на основе молока	Сырные продукты (аналоги сыров), забеливатели для кофе, кисломолочные продукты и молочные напитки	Йогурты, сыры и сырные спреды
Напитки	Какао, газированные напитки, плодово-ягодные напитки, сливочные ликеры, винные аперитивы, пиво	Безалкогольные напитки, фруктовые соки, сухие концентраты и замороженные апельсиновые напитки, ароматизированные напитки на молочной основе
Десерты	Мороженое, замороженные десерты, муссы, пудинги быстрого приготовления, взбитые топпинги	Мороженое, фруктовый лед, глазури для замороженных десертов
Кондитерские изделия	Ирис, карамель, молочные конфеты, сливочная помадка, пастила, нуга	Взбивные (аэрированные) кондитерские смеси, меренги, бисквиты
Мясные продукты	Фарши	Сосиски, «роллы для завтрака», рассолы для инъецирования в целях обогащения

зерновых завтраков, снеков и макаронных изделий, а также для хлебобулочных изделий, в которых они обеспечивают нужную текстуру и характеристики тестообразования.

Казеинаты (натрия, калия и кальция) получают путем нейтрализации кислотного казеина перед сушкой соответствующей щелочью. Эти изоляты, особенно казеинаты натрия и калия, очень хорошо растворимы и термостойки при самых разных условиях. Благодаря своей амфифильной структуре эти белки используют для эмульгирования, связывания воды, загущения, взбивания, а также пено- и гелеобразования. Эти изоляты получили широкое распространение как эмульгаторов и влагоудерживающих агентов в производстве мясных продуктов, текстурированных продуктов из растительного белка, маргарина, топпингов, заменителей сливок и забеливателей для кофе.

15.5.2.3. Сывороточные белки

Концентраты сывороточных белков (КСБ) или их изоляты (ИСБ) являются весьма востребованными пищевыми ингредиентами. Это обусловлено высокой концентрацией в них серосодержащих аминокислот (по сравнению с растительными белками типа соевых). Ежегодное мировое производство сывороточных белков составляет около 600 000 т. В прошлом эти продукты — лактальбумин (его не следует путать с α-лактальбумином), протеин-метафосфатный или протеин-карбоксиметилцеллюлозный комплексы) — обладали ограниченными функциональными свойствами из-за высокой степени денатурации белка или присутствия в них осаждающих реагентов. Благодаря промышленному внедрению мембранных технологий, включая ультра- и диафильтрацию (соответственно УФ и ДФ), а также ионообменной адсорбции (*IEA*), появились многочисленные продукты с разнообразными и высокими функциональными свойствами [46, 47]. Тремя используемыми в настоящее время *IEA*-технологиями являются технология «Вистек» (*Vistec*, на целлюлозном ионообменнике), «*Spherosil S*» (на основе пористого силикагелевого катионообменника) и технология *Spherosil QMA* (на основе пористого силикагелевого анионообменного материала).

Основными факторами, определяющими функциональные свойства продукта, являются степень денатурации белка и содержание лактозы, липидов и минеральных веществ. В целом денатурация белка снижает растворимость и неблагоприятно влияет на свойства, требующие высокой поверхностной активности (эмульгирующую и пенообразующую способность). Так, УФ-КСБ, УФ/ДФ-КСБ и ИСБ *Spherosil QMA* характеризуются высокой растворимостью и хорошими эмульгирующими свойствами благодаря низкой

степени денатурации белка. Присутствие липидов ухудшает пенообразующие свойства и способность к взбиванию, так что УФ-КСБ должен быть обезжирен, тогда как препарат «ИСБ *Spherosil QMA*» обладает высокими пенообразующими свойствами и способностью к взбиванию. В изолятах сывороточного белка «*Vistec*» и «*Spherosil S*» денатурировано более 50% белка, но «*Vistec*» является хорошим эмульгатором (возможно, благодаря тому, что β-лактоглобулин, термически денатурированный при щелочном значении pH, остается растворимым при pH 6). Различия между ИСБ «*Vistec*» и «*Spherosil S*» свидетельствуют о важности для функциональных свойств белкового продукта структуры и/или состава денатурированной формы. Поскольку неденатурированные формы сывороточных белков в кислых условиях растворимы, их следует применять в рецептурах продуктов кислого типа, например, обогащенных напитков, газированных углекислотой.

В некоторых областях применения (например, в выпечных или текстурированных пищевых продуктах) для обеспечения текстуры и требуемых реологических свойств продукта важна агрегация белка, но особое значение должно придаваться структуре денатурированной связанной формы. Разработка имитаторов жира на основе сывороточных белков — это своего рода иллюстрация важности контроля степени и типа денатурации белка для обеспечения требуемых функциональных свойств в готовом продукте.

15.5.2.4. Лактоза

Области применения лактозы обусловлены ее низкой относительной сладостью, способностью стабилизировать белки, характером кристаллизации, способностью усиливать вкус и аромат, нутритивными свойствами (включение лактозы в рацион способствует усвоению кальция и других минеральных веществ) и участием в реакциях Майяра [50]. Считается, что относительная сладость лактозы составляет одну шестую сладости сахарозы, но данные последних исследований свидетельствуют, что ее относительная сладость варьирует в зависимости от концентрации и составляет от половины до четверти сладости сахарозы. Поскольку сахара часто используют в целях повышения вязкости, улучшения вкуса и текстуры, лактоза способна участвовать в этих процессах, не будучи при этом слишком сладкой. Тем самым лактоза может заменять сахарозу в топпингах и глазурях, улучшая внешний вид и стабильность, одновременно снижая сладость готовых изделий. В отличие от многих других пищевых сахаров добавление лактозы не снижает растворимость сахарозы. Более того, при увеличении концентрации лактозы меняется и форма кристаллов как сахарозы, так и лактозы*. Кристаллы обоих сахаров становятся меньше, что способствует получению более мягкого и однородного продукта. Тем самым добавлением лактозы можно улучшить качество кондитерских изделий.

Одна из основных функций лактозы в производстве хлебобулочных и мучных кондитерских изделий состоит в том, чтобы улучшать цвет корочки («поджаристость») посредством реакций Майяра. При добавлении лактозы к печенью она увеличивает объем, размягчает и улучшает текстуру. Кроме того, в дрожжевых изделиях лактоза остается доступной для реакций неферментативного потемнения, поскольку хлебопекарными дрожжами она не утилизируется.

Вместе с другими полиолами лактоза стабилизирует структуру белка в растворе. Благодаря этому своему свойству она нашла применение, в частности, для уменьшения перехода липовителлина в нерастворимую форму в процессе лиофилизации и для сохранения активности химозина в ходе распылительной сушки.

15.5.2.5. Функциональные свойства липидов молока

Липиды молока придают уникальные характеристики внешнему виду, текстуре, вкусу и аромату, а также стабильности молочных продуктов. Именно поэтому так трудно найти подходящие заменители молочного жира для маложирных и обезжиренных продуктов. В настоящее время некоторые (но не все) функции замещаемого жира выполняют имитаторы жира на белковой или углеводной основе. Особенно трудно подобрать имитаторы жира, которые обладали бы требуемыми вкусоароматическими свойствами и стабильностью.

---

* Форма (габитус) кристаллов — это внешний вид кристаллов, определяемый преобладающим развитием граней тех или иных простых форм. Габитус может быть призматическим, дипирамидальным, ромбоэдрическим, кубическим и др. — *Примеч. ред.*

В жире смешанного состава его точка плавления, кристаллизационные и реологические свойства обусловлены структурой триацилглицеринов, так что любое изменение состава ТАГ будет влиять на эти свойства. Фракционирование молочного жира (например, путем постепенной кристаллизации или с использованием экстракции сверхкритическим газами) позволяет получать липидные фракции с уникальными функциональными свойствами, требуемыми в производстве таких продуктов, как спреды, хлебобулочные или мучные кондитерские изделия. Жирнокислотный состав триацилглицеринов можно изменить переэтерификацией в присутствии специально добавленных жирных кислот. Эта реакция, катализируемая иммобилизованной липазой и объединенная с фракционированием липидов, позволяет модифицировать молочный жир и обеспечить желаемые функциональные свойства.

15.6. Питательные свойства молока

15.6.1. Состав нутриентов молока и молочных продуктов

Молочные продукты вносят значительный вклад в рационы населения США. Американцы получают из молочных продуктов четверть и более белка, кальция, фосфора и рибофлавина (рис. 15.7). Состав нутриентов молока приведен в табл. 15.17, где отражен состав свежего непастеризованного и пастеризованного цельного молока без витамина D, поскольку им обогащают питьевое молоко в концентрации 41 МЕ/100 г, что эквивалентно примерно 35% рекомендуемой нормы суточного потребления (в пересчете на 250 $см^3$).

Расчет нутритивной плотности, то есть той процентной доли нутриента от его рекомендуемой суточной нормы потребления (РСНП), которая обеспечивается в определенной порции по калорийности или массе продукта, позволяет достоверно сравнивать нутритивное качество различных продуктов. Приняв в качестве базы для сравнения 2000 ккал (8372 кДж, примерная калорийность, обычно рекомендуемая для взрослого населения США), можно рассчитать долю от РСНП в одной порции различных молочных продуктов. Например, в 240 мл маложирного молока (жирностью 1%) содержится 4% от РСНП общего жира, 7% насыщенных жиров, 3% холестерина, 5% натрия и 4% общих углеводов. В качестве основы для расчетов нутритивной плотности на этикетках пищевых продуктов приводятся как 2000, так и 2500 ккал (10 465 кДж) (рис. 15.8). Хотя некоторые нутриенты не обязательно указывать на этикетке, очевидно, что молоко является отличным источником белка, рибофлавина, витамина B_{12}, кальция и фосфора, а также хорошим источником витамина A, тиамина, ниацина и магния. При обезжиривании молока удаляется большинство нативно присутствующих жирорастворимых витаминов (A, D и E), однако значительно возрастает плотность других нутриентов. При производстве сыра значительно снижается содержание водорастворимых витаминов из-за их частичного выведения в подсырную сыворотку, однако содержание кальция в сычужных сырах не уменьшается (в отличие от кисломолочных сыров, где он остается в свернутых казеиновых мицеллах).

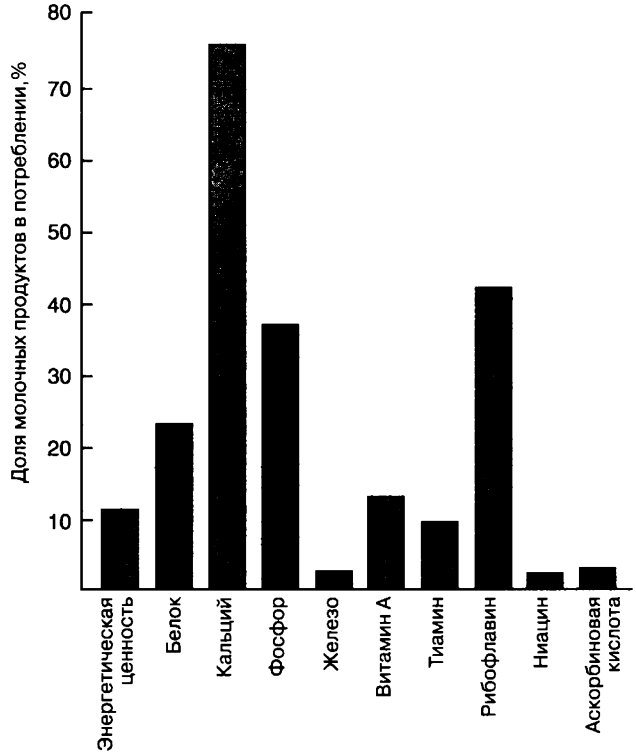


Рис. 15.7. Вклад молочных продуктов в общее потребление нутриентов в США. [По 36]

Как правило, пищевая ценность и нутритивные свойства белка важнее его количества. Молочные белки очень хорошо соответствуют потребностям человека и считаются высококаче-

Таблица 15.17
Состав нутриентов цельного молока жирностью 3,3%/ По [1, 55]

Нутриент*	Содержание в 100 г молока	Доля от рекомендуемой нормы суточного потребления** в пересчете на 250 см³
Белок	3,29 г	17,2
Витамин А	31 РЭ***	8,9
Виамин С	0,94 мг	4,2
Тиамин	0,038 мг	8,2
Рибофлавин	0,162 мг	30,0
Ниацин	0,85 НЭ****	13,9
Витамин B_6	0,042 мг	6,5
Фолацин	5 мкг	6,4
Витамин B_{12}	0,357 мкг	46,1
Кальций	119 мг	32,0
Фосфор	93 мг	25,0
Магний	13 мг	10,2
Железо	0,05 мг	0,9
Цинк	0,38 мг	6,5

* Все нутриенты, для которых разработаны рекомендуемые нормы суточного потребления, за исключением витаминов D и E, а также йода, по которым в Справочнике Министерства сельского хозяйства США [1] нет данных.

** Приведены средние рекомендуемые нормы суточного потребления для мужчин и женщин старше 11 лет.

*** РЭ — ретиноловый эквивалент: 1 мкг ретинола или 6 мкг β-каротина.

**** НЭ — ниациновый эквивалент: 1 мг ниацина или 60 мг поступающего с пищей триптофана. В молоке содержится лишь 10% НЭ в форме ниацина.

ственными. Если принять биологическую ценность яичного белка за 1, то биологическая ценность белка сырого молока составляет 0,9 [58]. В молочных белках немного меньше серосодержащих аминокислот, метионина и цистеина, что делает их не совсем «идеальными». Поскольку в сывороточных белках серосодержащих аминокислот больше, чем в казеинах, то у них биологическая ценность выше, чем у казеинов (соответственно 1,0 и 0,8). При этом следует учитывать, что казеины благодаря своей структуре легче усваиваются.

15.6.2. Непереносимость лактозы

У довольно большого процента населения Африки и Азии в кишечнике вырабатывается меньше β-галактозидазы (лактазы), чем у европейцев или североамериканцев, из-за чего у жителей Африки и Азии чаще встречается непереносимость лактозы. Симптомами непереносимости лактозы являются диарея, метеоризм и спазмы в животе [23]. Вместе с тем, такой дефицит лактазы в организме бывает выражен по-разному [20, 23, 36]. Поскольку типичный тест на непереносимость лактозы проводится на основе очень большой дозы (1–2 г лактозы/кг массы тела), опубликованные данные о частоте встречаемости непереносимости лактозы можно считать несколько завышенными. Так, среди испытуемых с непереносимостью лактозы зачастую не отмечается непереносимости молока, потребляемого в количествах менее 240 мл (одного стакана) [20]. Кроме того, иногда непереносимость молока не обусловливается нарушением усвоения лактозы. Тем не менее, для значительной доли населения полезнее употреблять молоко с предварительным гидролизом лактозы (существуют способы промышленного гидролиза лактозы молока с использованием низких доз растворимой или иммобилизованной микробной лактазы). Поскольку в низких дозах лактозу не переносит гораздо меньше людей, а лиц с непереносимостью лактозы можно обеспечить либо молоком с гидролизованной лактозой, либо промышленно выпускаемой лактазой в жидкой или таблетированной форме, молочные продукты следует рассматривать как важную часть разнообразного и сбалансированного рациона. Кроме того, они являются отличными продуктами для устранения дефицита нутриентов в глобальном масштабе.

Цельное молоко

Нутриенты и калорийность 1-го стакана (240 см³)

Калорийность, всего 150 — Калорийность жира 70

	Доля от РСНП (рекомендуемой нормы суточного потребления)*
Общий жир 8 г	13%
Насыщенные жиры 5 г	26%
Холестерин 35 мг	11%
Натрий 120 мг	5%
Общие углеводы 12 г	4%
Пищевые волокна 0 г	0%
Сахара 12 г	
Белок 8 г	

Витамин А 6% • Витамин С 4%

Кальций 30% • Железо 0%

*Процентные значения исходя из рациона в 2000 ккал. Конкретные суточные значения могут быть выше или ниже в зависимости от потребности в калориях:

	Калории	2000	2500
Общий жир	Менее	65 г	80 г
Насыщенные жиры	Менее	20 г	25 г
Холестерин	Менее	300 мг	300 мг
Натрий	Менее	2400 мг	2400 мг
Общие углеводы		300 г	375 г
Пищевые волокна		25 г	30 г

Маложирное молоко (жирностью 1%)

Нутриенты и калорийность 1-го стакана (240 см³)

Калорийность, всего 110 — Калорийность жира 20

	Доля от РСНП *
Общий жир 2,5 г	4%
Насыщенные жиры 1,5 г	7%
Холестерин 10 мг	3%
Натрий 130 мг	5%
Общие углеводы 12 г	0%
Пищевые волокна 0 г	12%
Сахара 12 г	
Белок 8 г	

Витамин А 10% • Витамин С 4%

Кальций 30% • Железо 0%

*Процентные значения исходя из рациона в 2000 ккал. Конкретные суточные значения могут быть выше или ниже в зависимости от потребности в калориях:

	Калории	2000	2500
Общий жир	Менее	65 г	80 г
Насыщенные жиры	Менее	20 г	25 г
Холестерин	Менее	300 мг	300 мг
Натрий	Менее	2400 мг	2400 мг
Общие углеводы		300 г	375 г
Пищевые волокна		25 г	30 г

Сыр (Чеддер)

Размер порции — 28 г Порций в упаковке — 16

Нутриенты и калорийность 1-й порции

Калорийность, всего 110 — Калорийность жира 80

	Доля от РСНП *
Общий жир 9 г	14%
Насыщенные жиры 6 г	30%
Холестерин 30 мг	10%
Натрий 170 мг	7%
Общие углеводы 0 г	0%
Пищевые волокна 0 г	0%
Сахара 0 г	
Белок 7 г	

Витамин А 6% • Витамин С 0%

Кальций 20% • Железо 0%

*Процентные значения исходя из рациона в 2000 ккал. Конкретные суточные значения могут быть выше или ниже в зависимости от потребности в калориях:

	Калории	2000	2500
Общий жир	Менее	65 г	80 г
Насыщенные жиры	Менее	20 г	25 г
Холестерин	Менее	300 мг	300 мг
Натрий	Менее	2400 мг	2400 мг
Общие углеводы		300 г	375 г
Пищевые волокна		25 г	30 г

Йогурт

Нутриенты и калорийность 1-й чашки (225 см³)

Калорийность, всего 230 — Калорийность жира 20

	Доля от РСНП *
Общий жир 2,5 г	4%
Насыщенные жиры 1,5 г	8%
Холестерин 10 мг	3%
Натрий 130 мг	5%
Общие углеводы 43 г	4%
Пищевые волокна 0 г	0%
Сахара 34 г	
Белок 10 г	

Витамин А 10% • Витамин С 4%

Кальций 30% • Железо 0%

*Процентные значения исходя из рациона в 2000 ккал. Конкретные суточные значения могут быть выше или ниже в зависимости от потребности в калориях:

	Калории	2000	2500
Общий жир	Менее	65 г	80 г
Насыщенные жиры	Менее	20 г	25 г
Холестерин	Менее	300 мг	300 мг
Натрий	Менее	2400 мг	2400 мг
Общие углеводы		300 г	375 г
Пищевые волокна		25 г	30 г

Рис. 15.8. Типичные новые этикетки некоторых молочных продуктов. Характеристики молока, сыра и йогурта

15.6.3. Влияние технологии переработки на пищевую ценность молочных продуктов

15.6.3.1. Влияние на белки

В большинстве способов технологической переработки (пастеризация, стерилизация, концентрирование и дегидратация) молочных продуктов применяется нагревание. Их эффекты можно разделить на две категории: а) изменение вторичной, третичной и четвертичной структуры белков и б) изменение их первичной структуры. Способы, обеспечивающие «развертывание» молекул белков, могут повышать и биологическую ценность белка, поскольку пептидные связи становятся более доступными для пищеварительных ферментов, тогда как изменение первичной структуры может снизить усвояемость и привести к образованию биологически недоступных остатков. Кроме того, тепловая обработка молока может привести к β-элиминированию остатков цистина и фосфосерина с образованием дигидроаланина. Последнее соединение легко вступает в реакцию с остатками лизина с образованием в белковой цепи лизино-аланиновых поперечных сшивок. Лизиноаланин биологически не доступен, в связи с чем образование таких поперечныхе сшивок снижает усвояемость белка. Более того, поскольку пищевая ценность молочных белков ограничивается из-за пониженного содержания серосодержащих аминокислот, эти изменения особенно важны. Пастеризация и УВТ-обработка не приводят к образованию большого количества остатков лизиноаланина (в отличие от стерилизации в консервных банках).

Даже щадящие режимы тепловой обработки инициируют реакции Майяра, в ходе которых образуются лактулозо-лизин и другие соединения, снижающие содержание доступного лизина. Его потери при пастеризации (1–2%) или УВТ-стерилизации (2–4%) незначительны, однако более жесткие режимы, в том числе высокотемпературное сгущение выпариванием или стерилизация в банках, могут стать причиной более чем 20%-ных потерь доступного лизина [56]. Длительное хранение УВТ-продуктов при температурах выше 35 °С также может значительно снизить содержание доступного лизина. Поскольку в молочных белках содержится избыточное количество лизина, его небольшие потери нутритивного значения не имеют (за исключением случаев, когда молочные продукты употребляются в целях восполнения дефицита лизина).

15.6.3.2. Влияние на витамины

Жирорастворимые витамины молока — А (в том числе каротин), D и Е — и водорастворимые витамины (рибофлавин, пантотеновая кислота, биотин и никотиновая кислота), достаточно стабильны [56] и не дают каких-либо заметных потерь при пастеризации или УВТ-стерилизации (табл. 15.18). Вместе с тем тиамин, витамины B_6 и B_{12}, фолиевая и аскорбиновая (витамин С) кислоты более чувствительны к нагреванию и/или окислительной деградации. Особенно чувствительны к окислительной деградации при обработке и последующем хранении витамины С, B_{12} и фолиевая кислота. Первый продукт окисления витамина С (дегидроаскорбат, обладающий активностью витамина С) очень чувствителен к нагреванию, тогда как собственно аскорбат довольно термостоек. Для сохранения этих витаминов рекомендуется применять способы переработки молока, не допускающие присутствия кислорода или удаляющие его, а также упаковку с высокими барьерными свойствами по отношению к кислороду.

Как правило, пастеризация и УВТ-стерилизация молока в надлежащих условиях приводят к гораздо меньшим потерям витаминов, чем нагревание в ходе обычной кулинарной обработки пищи в домашних условиях. Если молочный продукт хранится долгое время, очень важны тип упаковки и условия хранения. Помимо высоких барьерных свойств по отношению к кислороду, важна также светонепроницаемость упаковки, что способствует не только предотвращению образования посторонних вкусов и запахов, но и потерям рибофлавина.

Жесткие режимы тепловой обработки молока типа стерилизации в банках или сушки могут обусловливать значительные потери многих витаминов. Особенно это касается витамина B_{12}, поскольку молоко — важный его пищевой источник. Для производства молочных продуктов, пригодных для длительного хранения, микробиологически безопасных и почти с неизменным содержанием нативных нутриентов, необходимо понимать причины, приводящие к изменению компонентов молока, и использовать те способы переработки, которые минимизируют эти изменения, в том числе УВТ-обработку и исключение воздействия кислорода и света в ходе переработки и хранения.

Таблица. 15.18

Потери витаминов при разных способах переработки молока, %. По [58]

Витамины	Пастеризация (15 с при 71–73 °С)	УВТ-стерилизация (1–4 с при 130–150 °С)	Распылительная сушка*	Сгущение **
Витамин А	0	0	0	0
Тиамин	10	10	10	40
Рибофлавин	0	0	0	0
Никотиновая кислота	0	0	0	5
Витамин B_6	0	10	0	40
Витамин B_{12}	10	10	30	80
Витамин С	10–25	25	15	60
Фолиевая кислота	10	10	10	25
Пантотеновая кислота	0	0	0	0
Биотин	0	0	10	10

* С предварительной тепловой обработкой (10–15 с при 80–90 °С), гомогенизацией и сгущением при пониженном давлении. Распылительная сушка концентрата молока проводится при 90 °С в течение 4–6 с.

** С предварительной тепловой обработкой (10 мин при 95 °С). Концентрирование проводится при 50 °С при пониженном давлении, а стерилизация — в банках автоклавированием (15 мин при 115 °С).

15.7. Биоактивные пептиды из молочных белков

В молочных белках имеются последовательности пептидов, влияющие на различные биологические функции — секрецию гормонов, иммунитет, всасывание нутриентов, передачу неврологической информации и рост микроорганизмов [10, 11, 18]. Эти пептиды высвобождаются *in vivo* в желудке и/или кишечнике благодаря протеолитической активности пищеварительных ферментов. Такие пептиды можно синтезировать *in vitro* из специфических молочных белков с использованием соответствующих протеиназ или путем химического синтеза. Полученные таким образом пептиды можно было бы добавлять в пищу или продукты специального назначения.

15.7.1. Производные казеинов

Некоторые пептиды (казокинины) — производные α_{S1}- и β-казеина — обладают противогипертонической активностью, так как ингибируют ангиотензинпревращающий фермент (АПФ). Поскольку АПФ превращает ангиотензин I в ангиотензин II, АПФ-ингибиторы снижают артериальное давление и уровень альдостерона, а также активируют депрессорное действие брадикинина. Производными α_{S1}- и β-казеинов являются также два пептида, обладающих антимикробной активностью — израцидин и казоцидин-I. Эти пептиды активны как против грамположительных, так и грамотрицательных штаммов. Гликомакропептид, образующийся из к-казеина в процессе сыроделия, обладает противокариесной активностью благодаря ингибированию роста стрептококков в ротовой полости и образования зубного налета, в связи с чем его используют в некоторых стоматологических препаратах. Фосфопептидные области казеинов, чувствительных к кальцию, обладая хорошими свойствами относительно связывания кальция, устойчивы к протеолизу. Поэтому эти казеинофосфопептиды (производные α_{S1}-, α_{S2}- и β-казеинов), присутствуя в тонком кишечнике, повышают растворимость кальция и облегчают транспорт кальция через кишечную стенку, улучшая тем самым всасывание кальция и минерализацию костей. Данные о биологической активности биоактивных производных казеинов молока приведены в табл. 15.19.

В настоящее время идентифицирован ряд пептидов, обладающих опиоидной активностью. Некоторые производные β-казеина, благодаря их морфиноподобной активности называют β-казоморфинами. Хотя их первичная структура немного отличается от типичных опиоидных пептидов (эндорфинов), эти атипичные пептиды являются антагонистами опиоидов, так как их структуры хорошо помещаются в связывающий карман опиоидного рецептора. В результате они способны модулировать время желудочно-кишечного транзита, противодиарейный эффект, транспорт аминокислот и эндокринную активность поджелудочной железы, увеличивая секрецию инсулина. Пептиды казоксин *D* из αS1-казеина и казоксин *C* из к-казеина действуют как опиоидные антагонисты.

Таблица 15.19
Биологически активные пептиды — производные казеинов молока

Белок	Общепринятое название	Пептид	Биологическая активность
α_{S1}-Казеин	Израцидин	α_{S1}-Казеин (*f*1–23)	Антимикробная
	α_{S1}-Казокинин-5	α_{S1}-Казеин (*f*23–27)	Антимикробная, ингибирование АПФ
	Казеинофосфопептид	α_{S1}-Казеин (*f*59–79)	Связывание и транспорт кальция
	α-Казеин-экзорфин	α_{S1}-Казеин (*f*90–96)	Опиоидный агонист
	Казоксин *D*	α_{S1}-Казеин (*f*158–164)	Опиоидный антагонист
α_{S2}- Казеин	Казоцидин-I	α_{S2}-Казеин (*f*165–203)	Антимикробная
β-Казеин	β-Казокинин-7	β-Казеин (*f*177–183)	Ингибирование АПФ
	β -Казокинин -10	β-Казеин (*f*193–202)	Ингибирание АПФ, иммуномодулирование
	β-Казоморфин-5	β-Казеин (*f*60–64)	Опиоидный агонист
	Морфицептин	β-Казеин (*f*60–63 амид)	Опиоидный агонист
к-Казеин	Казоплателин	к-Казеин (*f*106–116)	Антитромботическая
	Пептид, подавляющий тромбин	к-Казеин (*f*112–116)	Антитромботическая
	Гликомакропептид	к-Казеин (*f*106–169)	Подавление агрегации тромбоцитов, противокариозная и иммуномодулирующая
	Казоксин С	к-Казеин (*f*25–34)	Опиоидный антагонист

Несколько пептидов (в основном производные к-казеина) обладают антитромботической и/или иммуномодулирующей активностью. Так, гликомакропептид стимулирует синтез *IgA* и индуцирует пролиферацию *B*-лимфоцитов, а также подавляет агрегацию тромбоцитов, снижая тем самым тромбообразование. Антитромботической активностью обладают и некоторые другие пептиды из гликомакропептидной области к-казеина.

15.7.2. Производные сывороточных белков

Существует ряд антимикробных пептидов, являющихся производными β-лактоглобулина и α-лактальбумина. По-видимому, они активны только относительно грамположительных бактерий. β-Лакторфины (производные β-лактоглобулина) обладают АПФ-ингибирующей активностью, а один из них является также опиоидным агонистом (табл. 15.20).

Таблица 15.20
Биологически активные пептиды — производные сывороточных белков

Белок	Общепринятое название	Пептид	Биологическая активность
β-Лактоглобулин	Нет	β-Лактоглобулин (*f*15–20)	Антимикробная
	Нет	β-Лактоглобулин (*f*25–40)	Антимикробная
	Нет	β-Лактоглобулин (*f*78–83)	Антимикробная
	Нет	β-Лактоглобулин (*f*92–100)	Антимикробная
	β-Лакторфин	β-Лактоглобулин (*f*142–148)	Ингибирование АПФ
	β-Лакторфин (амид)	β-Лактоглобулин (*f*102–105)	Опиоидный агонист, ингибирование АПФ
α-Лактальбумин	Нет	α-Лактальбумин (*f*17–31S–S109–114)	Антимикробная
	Нет	α-Лактальбумин (*f*61–68S–S75–80)	Антимикробная
Лактоферрин	Лактоферрицин В	Лактоферрин (*f*17–41)	Антимикробная

Наиболее известным и хорошо изученным пептидом с антимикробными свойствами является лактоферрицин В (производное лактоферрина). Исследования показали, что употребление детских смесей или напитков для взрослых с добавкой лактоферрина обычно приводит к относительно высокому уровню это-

го пептида в желудочно-кишечном тракте, что может оказаться полезным. Лактоферрицин В обладает бактерицидной активностью относительно патогенных штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, сопоставимой с антибиотиками. Лактоферрин В также индуцирует апоптоз в лейкозной клеточной линии, происходящий при участии внутриклеточных реакционноспособных форм кислорода и активируемый эндонуклеазами. Кроме того, этому пептиду приписываются антивирусные, иммунорегулирующие и противовоспалительные свойства.

Дополнительная литература

Fox P. F. Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins. — London: Applied Science, 1982.

Fox P. F. Developments in Dairy Chemistry. 2. Lipids. — London: Applied Science, 1983.

Fox P. F. Fox P. F. Developments in Dairy Chemistry. 3. Lactose and Minor Constituents. — London: Elsevier Applied Science, 1985.

Fox P. F. Developments in Dairy Chemistry. 4. Functional Milk Proteins. — London: Elsevier Applied Science, 1989.

Fox, P. F. Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins. — London: Elsevier Applied Science, 1992.

Fox P. F., McSweeney P. L. H. Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins. — 3rd ed. — Part A. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

Walstra P., Jenness R. Dairy Chemistry and Physics. — NY: John Wiley & Sons, 1984.

Литература

1. Agriculture Handbook № 8-1. Composition of Foods, Dairy and Egg Productsю — U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1976.
2. Hoards Dairyman, 1994, 139(6), p. 271.
3. Bauman D. E., Davis C. L. Biosynthesis of milk fat // *Lactation — A Comprehensive Treatise* / B. L. Larson, V. R. Smith (eds.). — Vol. II. — NY: Academic Press, 1974. — P. 31–75.
4. Bernstein F. C, Koetzle T. F., Williams G. J. B. et al. The protein databank: a computer-based archival file for macromolecular structures // *J. Mol. Biol.* 1977, 112, p. 535–542.
5. Brew K.. α-Lactalbumin // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, eds. — 3rd ed., Part A. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 387–419.
6. Brew K., Grobler J. A. α-Lactalbumin // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — p. 191–229.
7. Brunner J. R. Physical equilibria in milk: the lipid phase // *Fundamentals of Dairy Chemistry* / B. H. Webb, A. H. Johnson (eds). — Westport, CT: AVI, 1965. — P. 403–505.
8. Brunner J. R. Cow milk proteins: twenty-five years of progress // *J. Dairy Sci.*, 1981, 64, p. 1038–1054.
9. Brunner J. R., Ernstrom C. A., Hollis R. A., Larson B. L., Whitney R. McL., Zittle C. A. Nomenclature of the proteins of bovine milk —first revision // *J. Dairy Sci.* 1960, 43, p. 901–911.
10. Clare D. A., Swaisgood H. E. Bioactive milk peptides: a prospectus // *J. Dairy Sci.*, 2000, 83, p. 1187–1195.
11. Clare D. A., Catignani G. L., Swaisgood H. E. Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides // *Curr. Pharmaceut. Des.*, 2003, 9, p. 1239–1255.
12. Corbin E. A., Whittier E. O. The composition of milk // *Fundamentals of Dairy Chemistry* / B. H. Webb, A. H. Johnson (eds). — Westport, CT: AVI, 1965. — P. 1–36.
13. Creamer L. K., Berry G. P., Mills O. E. A study of the dissociation of β-casein from the bovine casein micelle at low temperature // *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 1977, 12, p. 58–66.
14. Davies D. T., White J. C. D. The use of ultrafiltration and dialysis in isolating and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases // *J. Dairy Res.*, 1960, 27, p. 171–190.
15. De Kruif C. G., Holt C. Casein micelle structure, functions and interactions // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (eds.). — 3rd ed., Part A. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 233–276.
16. De Wit J. N. Functional properties of whey proteins // *Development in Dairy Chemistry. 4. Functional Milk Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1989. — P. 285–321.
17. Farkye N. Y. Other enzymes // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — P. 339–367.
18. Fitzgerald R. J., Meisel H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (eds.) — 3rd ed., Part B. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 675–698.
19. Fox P. F. Heat-induced changes in milk preceding coagulation // *J. Dairy Sci.*, 1981, 64, p. 2127–2137.
20. Garza C. Appropriateness of milk use in international supplementary feeding programs // *J. Dairy Sci.*, 1979, 62, p. 1673–1684.

21. Gresti J. M., Bugant M., Maniongui C., Bezard J.. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat // *J. Dairy Sci.* 1993, 76, p. 1850–1869.
22. Hambling S. G., McAlpine A. S., Sawyer L. β-Lactoglobulin // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — P. 141–190.
23. Hansen R. G. Milk in human nutrition // *Lactation —A Comprehensive Treatise* / B. L. Larson, V. R. Smith (eds). — vol. III. — NY: Academic Press, 1974. — P. 281–308.
24. Holt C. The milk salts: their secretion, concentrations and physical chemistry // *Developments in Dairy Chemistry. 3. Lactose and Minor Constituents* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1985. — P. 143–181.
25. Jenness R. The composition of milk // *Lactation — A Comprehensive Treatise* / B. Larson, V. R. Smith (eds.). — Vol. III. — NY: Academic Press, 1974. — P. 3–107.
26. Jenness R., Larson B. L., McMeekin T. L., Swanson A. M., Whitnah C. H., Whitney R. McL. Nomenclature of the proteins of bovine milk // *J. Dairy Sci.*, 1956, 39, p. 536–541.
27. Jensen R. G., Quinn J. G., Carpenter D. L., Sampugna J. Gas-liquid chromatographic analysis of milk fatty acids: a review // *J. Dairy Sci.*, 1967, 50, p. 119–125.
28. Jensen R. G., Ferris A. M., Lammi-Keefe C. J. The composition of milk fat // *J. Dairy Sci.*, 1991, 74, p. 3228–3243.
29. Kinsella J. E., Infante J. P. Phospholipid synthesis in the mammary gland // *Lactation — A Comprehensive Treatise* / B. L. Larson, V. R. Smith (eds). —Vol. IV. — NY: Academic Press, 1978. — P. 475–502.
30. Kitchen B. J. Indigenous milk enzymes // *Developments in Dairy Chemistry. 3. Lactose and Minor Constituents* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1985. — P. 239–279.
31. Kraulis P. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures // *J. Appl. Crystallogr.*, 1991, 24, p. 946–950.
32. Larson B. L. (ed.) *Lactation — A Comprehensive Treatise.* — Vol. IV. — NY: Academic Press, 1978.
33. Larson B. L., Smith V. R. (eds) *Lactation —A Comprehensive Treatise.* — Vol. 1. — NY: Academic Press, 1974.
34. Larson B. L., Smith V. R. (eds). *Lactation —A Comprehensive Treatise.* — Vol. II. — NY: Academic Press, 1974.
35. Larson B. L., Smith V. R. (eds) *Lactation —A Comprehensive Treatise.* — Vol. III. — NY: Academic Press, 1974.
36. Leveille G. A. United States food and nutrition issues — roles of dairy foods // *J. Dairy Sci.*, 1979, 62, p. 1665–1672.
37. Lindquist B. Casein and the action of rennin. — Part 1 // *Dairy Sci. Abstr.*, 1963, 25, p. 257–265.
38. Lindquist B. Casein and the action of rennin. — Part 2 // *Dairy Sci. Abstr.*, 1963, 25, p. 299–308.
39. Lizell J. L., Peaker M. Mechanism of milk secretion // *Physiol. Rev.*, 1971, 51, p. 564–597.
40. Mather I. A. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane // *J. Dairy Sci.* , 2000, 83, p. 203–247.
41. McKenzie H. A. Milk proteins // *Adv. Protein Chem.*, 1967, 22, p. 55–234.
42. McKenzie H. A. (ed.) *Milk Proteins.* — Vol. 1. — NY: Academic Press, 1970.
43. McKenzie H. A. (ed.). *Milk Proteins.* — Vol. II. — NY: Academic Press, 1970.
44. Morr C. V. Utilization of milk proteins as starting materials for other foodstuffs // *J. Dairy Res.*, 1979, 46, p. 369–376.
45. Morr C. V. Functional properties of milk proteins and their use as food ingredients // *Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Applied Science, 1982. — P. 375–399.
46. Morr C. V. Whey proteins: manufacture // *Developments in Dairy Chemistry. 4. Functional Milk Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1989. — P. 245–284.
47. Mulvihill D. M. Production, functional properties and utilization of milk protein products // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — P. 369–404.
48. Neville M. C. The physiological basis of milk secretion // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1990, 586, p. 1–11.
49. Nickerson T. A. Lactose // *Fundamentals of Dairy Chemistry* / B. H. Webb, A. H. Johnson (eds). — Westport, CT: AVI, 1965. — P. 224–260.
50. Niekerson T. A. Use of milk derivative, lactose, in other foods // *J. Dairy Sci.*, 1976, 59, p. 581–587.
51. Patton S., Jensen R. G. *Biomedical Aspects of Lactation.* — NY: Pergamon Press, 1976.
52. Payens T. A. J. Casein micelles: the colloid-chemical approach // *J. Dairy Res.*, 1979, 46, p. 291–306.
53. Pitas R. E., Sampugna J., Jensen R. G. Triglyceride structure of cow's milk fat. 1. Preliminary observations on the fatty acid composition of positions 1, 2 and 3 // *J. Dairy Sci.*, 1967, 50, p. 1332–1336.
54. Pyne G. T. Some aspects of the physical chemistry of the salts of milk // *J. Dairy Res.*, 1962, 29, p. 101–130.
55. *Recommended Dietary Allowances.* — 10th ed. — Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1989.
56. Renner E. Nutritional and biochemical characteristics of UHT milk // *Proc. of the Intern. Conf. on UHT Processing and Aseptic Packaging of Milk and Milk Products.* — Raleigh: Department of Food Science, North Carolina State University, 1980. — P. 21–52.
57. Rollema H. S. Casein association and micelle formation // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — P. 111–140.
58. Rolls B. A. Effect of processing on nutritive value of food: milk and milk products // *Handbook of Nutritive Value of Processed Food* / M. Rechcigl (ed.). — Vol. I. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1982. — P. 383–399.

59. Rose D., Brunner J. R., Kalan E. B. et al. Nomenclature of the protein's of cow milk: third revision // *J. Dairy Sci.*, 1970, 53, p. 1–17.
60. Sawyer L. β-Lactoglobulin // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* // P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (eds). — 3rd ed., Part A. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 319–386.
61. Schmidt D. G. Colloidal aspects of casein // *Neth. Milk Dairy J.*, 1980, 34, p. 42–46.
62. Shahani K. M., Harper W. J., Jensen R. G., Parry R. M., Jr., Zittle C. A. Enzymes in bovine milk: a review // *J. Dairy Sci.*, 1973, 56, p. 531–543.
63. Singh H., Creamer L. K. Heat stability of milk // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — P. 621–656.
64. Slattery C. W. Review: casein micelle structure; and examination of models // *J. Dairy Sci.*, 1976, 59, p. 1547–1556.
65. Slattery C. W. A phosphate-induced sub-micelle equilibrium in reconstituted casein micelle systems // *J. Dairy Res.*, 1979, 46, p. 253–258.
66. Slattery C. W., Evard R. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition // *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 317, p. 529–538.
67. Swaisgood H. E. The casein // *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, 1973, 3, p. 375–414.
68. Swaisgood H. E. Chemistry of milk protein // *Developments in Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Applied Science, 1982. — P. 1–59.
69. Swaisgood H. E. Chemistry of casein // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox (ed.). — London: Elsevier Applied Science, 1992. — P. 63–110.
70. Swaisgood H. E. Chemistry of the caseins // *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins* / P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (eds). — 3rd ed., Part A. — NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. — P. 139–201.
71. Thompson M. P., Brunner J. R., Stine C. M., Lindquist K. Lipid components of the fat-globule membrane // *J. Dairy Sci.*, 1961, 44, p. 1589–1596.
72. Thompson M. P., Tarassuk N. P., Jenness R., Lillevik H. A., Ashworth U. S., Rose D. Nomenclature of the proteins of cow's milk-second revision // *J. Dairy Sci.*, 1965, 48, p. 159–169.
73. Timmen H., Patton S. Milk fat globules: fatty acid composition, size and *in vivo* regulation of fat liquidity // *Lipids*, 1989, 23, p. 685–689.
74. U.S. Department of Agriculture Dairy S&O Yearbook. — DS-441, August. — Washington, D.C. 1993. — P. 1–39.
75. White J. C. D., Davies D. T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex // *J. Dairy Res.*, 1958, 25, p. 236–255.
76. Whitney R. Milk proteins // *Food Colloids* / H. D. Graham (ed.). — Westport, CT: AVI, 1977. — P. 66–151.
77. Whitney R. M., Brunner J. R., Ebner K. E. et al. Nomenclature of the proteins of cow's milk: fourth revision // *J. Dairy Sci.*, 1976, 59, p. 785–815.
78. Morr C. V. Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skimmilk casein micelles // *J. Dairy Sci.*, 1967, 50, p. 1744–1751.
79. Walstra P. Casein submicelles: do they exist? // *Int. Dairy J.*, 1999, 73, p. 1965–1979.
80. Holt C. Structure and stability of bovine casein micelles // *Adv. Protein Chem.*, 1992, 43, p. 63–151.

16. ФИЗИОЛОГИЯ И ХИМИЯ СЪЕДОБНЫХ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Гэйл Страсбург (*Gale Strasburg*), Ю Инь (*You Iing*), Л. Сюнь (*L. Xiong*), Вэнь Чань (*Wen Chiang*)
Перевод Д. К. Рапопорта под науч. ред. канд. фарм. наук О. И. Передеряева

Содержание

16.1. Введение 849
16.2. Пищевая ценность 849
16.3. Структура и функции мышечных тканей . . . 852
16.3.1. Структура скелетных мышц 852
16.3.2. Структура сердечной мышцы 857
16.3.3. Структура гладкой мышечной ткани 857
16.3.4. Мышечные белки . . . 857
16.3.4.1. Белки соединительной ткани и белковая матрица . . 858
16.3.4.2. Саркоплазматические белки 863
16.3.4.3. Сократительные белки . . . 865
16.3.4.4. Регуляторные белки 867
16.3.4.5. Структурные белки 868
16.3.4.6. Белки саркомплазматического ретикулума и сарколеммы 870
16.3.5. Механизм «возбуждение-сокращение» . . 871
16.3.6. Типы мышечной ткани . . 873
16.4. Превращение «мышечной ткани» в «мясо» . . . 874
16.4.1. Посмертное разрушение мышечных белков . . . 876
16.5. Влияние на качество мяса посмертных биохимических изменений . . . 877
16.5.1. Бледное, мягкое и водянистое мясо (*PSE*) . . 877
16.5.2. Темное, жесткое и сухое мясо (*DFD*) 878
16.5.3. Холодовое сокращение . . . 879
16.5.4. Окоченение при размораживании мяса 880
16.5.5. Электростимуляция 881
16.6. Химические изменения в мясе при консервировании 881
16.6.1. Охлаждение и холодильное хранение . 882
16.6.2. Замораживание 882
16.6.3. Обработка под высоким давлением . 883
16.6.4. Обработка облучением . 884
16.7. Химические изменения в переработанных мясных продуктах . . 885
16.7.1. Посол . . . 885
16.7.2. Гидратирование и удерживание влаги 886
16.7.3. Образование белкового гелевого матрикса 888
16.7.4. Иммобилизация и стабилизация жира 889
16.7.5. Реструктуризация мяса 891
16.7.6. Химия сурими . . . 891
Литература 892

16.1. Введение

Археологические находки свидетельствуют, что люди едят продукты животного происхождения, в том числе мясо, уже тысячи лет. Это подтверждается и обнаружением в 1991 г. альпинистами в леднике итальянских Альп останков древнего охотника, жившего 5100–5300 лет назад (местные жители дали ему имя Оззи). Многое свидетельствует о том, что он был убит стрелой другим охотником или группой охотников [1]. Его тело настолько хорошо сохранилось в ледниковом льду, что с помощью методов рекомбинации ДНК ученым удалось проанализировать содержимое его желудочно-кишечного тракта и определить, что Оззи ел в последние два приема пищи. Оказалось, что в предпоследний раз он ел мясо горного козла и разные виды растительной пищи, а в последний раз обедом ему служило мясо красного оленя и вновь растительная пища (зерно).

В истории известны общности людей, которые ели мясо по желанию, а другим приходилось его потреблять по необходимости. Употребление в пищу мяса во многом определялось культурно-религиозными факторами — одни виды мяса есть было можно, а другие нельзя. Например, в некоторых культурах запрещено употреблять свинину, а в других говядину. В частности, культурные традиции США запрещают есть конину, хотя в других странах ее есть можно. Некоторые люди вообще стараются не есть мясо по этическим и другим соображениям, например, считая вегетарианство полезным для здоровья. Вместе с тем отмечается, что по мере роста экономик отдельных стран, особенно развивающихся, в них увеличивается и спрос на мясные продукты.

Словом «мясо» в быту иногда называют красные мышечные ткани (говядину, свинину, баранину), тогда как мышечные ткани птицы и рыбы выделяются в отдельные товарные группы. В настоящей главе мы будем использовать понятие «мясо» в более широком смысле, обозначая им скелетные мышечные ткани млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных и рыб, в которых после смерти животного происходит последовательность биохимических реакций. В это понятие мы сознательно не включаем другие внутренние органы животных — печень, почки, тимус, а сердце и язык мы рассматриваем как особые виды тканей. Задача данной главы — ознакомить читателя с общими вопросами физиологии и биохимии мышечных тканей, лежащими в основе понимания биохимических изменений мышечных тканей, и с теми технологическими факторами, которые влияют на переработку мяса, его компоненты и их функциональные свойства.

16.2. Пищевая ценность

Приятные органолептические ощущения от свежих и переработанных мясных продуктов, а также чувство насыщения (сытости), возникающее после еды, в том числе после потребления мяса, делают пищевые продукты из мышечных тканей важной частью рациона населения разных стран. Высокое содержание нутриентов в мясе, то есть их доля в общей энергетической ценности, исчисляемой в килокалориях, разнообразие питательных веществ в мышечных тканях, а также высокая биодоступность нутриентов — все это делает мясо важным элементом рациона человека.

Состав мяса может быть очень разным. На него влияют вид животного, порода, пол, возраст, кормовой статус и уровень активности животного [2]. Более того, даже у одного животного на состав мышечных тканей влияет вид отруба, послеубойная обработка, условия хранения и, естественно, способ кулинарной обработки. Подробный анализ этих факторов выходит за рамки данной главы (за исключением ряда обобщений). Подробные данные о составе мясных продуктов в зависимости от вида животного, типа отруба, степени тримминга, наличия или отсутствия тепловой обработки можно получить в Министерстве сельского хозяйства США, причем эти сведения периодически обновляются [3], но даже эту информацию следует рассматривать как примерную, и данные могут существенно варьировать.

Примерный состав отдельных видов мышечной ткани постного мяса (от которого отделен внешний жировой слой) также может быть разным, но, как правило, он на 70% состоит из воды (из расчета на массу свежего постного мяса) (табл. 16.1). Эта вода преимущественно находится в межклеточном и внутриклеточном пространстве в свободном состоянии, а небольшая ее часть связана с белками. Вариации в содержании воды обычно обусловлены изменением жирового (липидного) состава. Содержание же белка варьирует от 18 до 23%, а содержание минеральных веществ и золы составляет примерно 1,0–1,2%.

Таблица 16.1
Примерный состав различных видов мяса, % от массы съедобной части. По [3]

Компонент	Мясо			Мясо птицы		Рыба	
	Говядина	Свинина	Баранина	Куриное мясо	Мясо индейки	Треска	Тунец
Вода	70,62	72,34	73,42	74,76	74,12	81,22	68,09
Белок	20,78	21,07	20,29	23,09	24,60	17,81	23,33
Жир	6,16	5,88	5,25	1,24	0,65	0,67	4,90
Минеральные вещества (зола)	1,02	1,04	1,06	1,02	1,02	1,16	1,18

Среди этих четырех компонентов мяса наиболее варьирует содержание и состав липидов. Поскольку липидные фракции мышечной и жировой ткани различаются по количеству и составу, их примерное содержание в продукте определяется в основном количеством в нем жировой ткани [4]. Более того, по мере снижения содержания в мясе жировых тканей увеличивается доля фосфолипидов (табл. 16.2). Большая часть липидов мяса состоит из нейтральных триглицеридов, несколько меньшего количества фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран, и небольшого количества холестерина, присутствующего главным образом в плазматических мембранах и нервных тканях. Жирные кислоты в нейтральной жировой фракции преимущественно более насыщены, чем жирные кислоты фосфолипидной фракции, что объяснимо с функциональной точки зрения. Необходимость присутствия клеточной мембраны в жидком виде при физиологических температурах требует, чтобы в фосфолипидах была высокая доля ненасыщенных жирных кислот, тогда как для поддержания целостности жировой ткани необходима большая доля насыщенных жирных кислот с высокой температурой плавления соответствующих триглицеридов. Несмотря на относительно меньшую долю фосфолипидов в общем составе жиров, их полиненасыщенная природа и высокое соотношение площади поверхности к объему делает эти липиды очень подверженными окислительным реакциям, обусловливающим ухудшение вкуса, запаха и цвета мяса [5].

Таблица 16.2
Липидный состав различных видов мяса. По [4]

Вид мяса	Тип мышечной ткани	Содержание, % от всей мышечной тани		
		Липиды	Из них нейтральных липидов, %	Из них фосфолипидов, %
Куриное мясо	Белое мясо	1,0	52	48
	Красное мясо	2,5	79	21
Мясо индейки	Белое мясо	1,0	29	71
	Красное мясо	3,5	74	26
Рыба (чукучан*)	Белое мясо	1,5	76	2
	Красное мясо	6,2	93	7
Говядина	*Lattisimus dorsi*	2,6	78	22
		7,7	92	8
		12,7	95	5
Свинина	*Lattisimus dorsi*	4,6	79	21
	Psoas major	3,1	63	37
Баранина	*Lattissimus dorsi*	5,7	83	10
	Semitendinosus	3,8	79	17

* Чукучан (лат. *Catostomus*) — род рыб из семейства чукучановых (*Catostomidae*). Большинство видов распространены в Северной Америке. На северо-востоке России обитает один вид чукучанов — чукучан обыкновенный (*Catostomus catostomus*). — *Примеч. ред.*

Липидный состав зависит от вида животного — самое высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в рыбе, а самое низкое в говядине и баранине (табл. 16.3). Липидный состав зависит также от вида мышечных тканей конкретного вида животного, особенно при сравнении мышечных тканей, в которых

Таблица 16.3
Жирнокислотный состав мяса и рыбы, % от общего жира [a]

Тип жирных кислот	Красное мясо			Мясо птицы		Рыба	
	Говядина[b]	Свинина[c]	Баранина[d]	Куриное мясо[e]	Мясо индейки[f]	Треска[g]	Тунец[h]
Насыщенные кислоты, всего	37,66	34,52	35,81	26,61	32,31	19,55	25,65
14:0	2,76	1,19	2,67	0,81	0,00	1,34	2,84
16:0	22,73	21,94	19,43	16,94	13,85	13,58	16,53
18:0	11,85	10,88	11,81	8,06	9,23	4,48	6,27
Мононенасыщенные, всего	42,37	45,24	40,19	24,19	16,92	14,03	32,65
16:1	3,73	3,23	3,05	2,42	1,54	2,39	3,31
18:1	38,31	41,16	36,38	20,16	13,85	9,10	18,86
Полиненасыщенные, всего	3,90	10,71	9,14	22,58	26,15	34,48	29,24
18:2	3,08	8,67	6,86	13,71	16,92	0,75	1,08
18:3	0,32	0,34	1,33	0,81	0,00	0,15	0,00
20:4	0,49	1,19	0,95	3,23	4,62	3,28	0,88

[a] Для красного нежирного мяса — из всех отрубов; для мяса птицы — из грудинки, для рыбы — из цельной тушки. Расчеты выполнены по данным [3].

[b] В среднем по жилованным отрубам с отделяемым жиром, жиловка до слоя жира 0,65 см (1/4 дюйма), всех сортов, в сыром виде.

[c] Свежая, не переработанная, в среднем по жилованным отрубам с отделяемым жиром (ножка, филейная часть, лопатка).

[d] Домашняя, в среднем по жилованным отрубам с отделяемым жиром, жиловка до слоя жира 0,65 см.

[e] Бройлеры или цыплята для жарки, только грудки, в сыром виде.

[f] Треска атлантическая, в сыром виде.

[g] Тунец голубой, в сыром виде.

метаболизм основан на окислительных механизмах (красные мышечные ткани) с тканями, метаболизм которых основан на гликолизе (белые мышечные ткани).

Содержание белка в мясе обычно получают на основании определения содержания общего азота в продукте (например, методом Къельдаля) и умножения полученного значения на коэффицент 6,25 (соответствует среднему содержанию азота в мышечном белке). Вместе с тем, полученные значения белка обычно несколько выше фактических, поскольку до 10% мышечного азота содержится в небелковых источниках, в том числе аминокислотах, пептидах, креатине, нуклеиновых кислотах и других азотсодержащих молекулах.

Мясо представляет собой отличный источник пищевого белка, так как аминокислотный состав мяса почти полностью соответствует потребностям организма человека в аминокислотах. Такой состав и относительно высокое содержание белка в мясе делает возможным обеспечение от 50 до 100% суточного потребления белка, необходимого организму человека, путем потребления одной 85-граммовой порции [6]. Более того, аминокислотный состав мяса дополняет другие пищевые источники белка. Например, добавление даже небольшого количества мяса к зерновым и бобовым, которые обычно бедны лизином и серосодержащими аминокислотами соответственно, резко повышает пищевую ценность этих растительных белков.

Мышечные ткани мяса являются также прекрасным источником многих водорастворимых витаминов, в том числе тиамина (B_1), рибофлавина (B_2), ниацина (PP), пиридоксина (B_6) и цианкобаламина (B_{12}) (табл. 16.4). Вместе с тем содержание витаминов, как и содержание других нутриентов, во многом зависит от вида животного, его пола, возраста и кормовой базы. Наиболее примечательными в этом отношении являются высокое содержание тиамина и низкое содержание цианкобаламина в свинине по сравнению с говядиной и бараниной. Как правило, в любом мясе относительно невелико содержание витаминов C, D, E и K, хотя по данным некоторых исследований содержание витамина E в мясе можно существенно увеличить путем его добавления в корма. Поскольку витамин E выполняет функции антиоксиданта, его повышенное содержание может оказать положительное влияние на стабилизацию цвета мяса, снижение темпов окисления липидов и благотворно воздействовать на здоровье человека [7].

Таблица 16.4

Содержание минеральных веществ и витаминов в мясе различных животных, соответственно мг/100 г и нг/100 г. По [3]

Минеральные вещества и витамины	Красное мясо			Мясо птицы		Рыба		*DRI*[a]
	Говядина	Свинина	Баранина	Куриное мясо	Мясо индейки	Треска	Тунец	*RDA* или *AI*[a]
Минеральные вещества:								
Калий	356	380	280	255	293	413	252	4700/4700[a]
Фосфор	199	211	189	196	206	203	254	700/700
Натрий	63	57	66	65	49	54	39,0	1500/1500[a]
Магний	22	23	26	28	28	32	50,0	420/320[b]
Кальций	6	16	10	11	10	16	8,0	1000/1000[a]
Цинк	4,33	2,08	4,06	0,8	1,24	0,45	0,60	11/8
Железо	2,13	0,91	1,77	0,72	1,17	0,38	1,02	8/18
Витамины:								
Тиамин		966	130	70	41	76	241	1200/1100
Рибофлавин	180	273	230	92	118	65	251	1300/1100
Ниацин	3590	4829	6000	11 194	6255	2063	8654	16 000/14 000
Пантотеновая кислота	360	788	700	819	717	153	1,054	5000/5000[a]
Пиридоксин	440	500	160	550	580	245	455	1300/1300
Фолиевая кислота	7,0	5,0	23,0	4,0	8,0	7	2,0	400/400
Цианокобаламин	3,25	0,67	2,62	0,38	0,47	0,91	9,43	2,4/2,4

[a] Значения *DRI* (*Dietary Reference Intakes*, эталонная норма потребления) выражены в виде *RDA* (*Recommended Dietary Allowances*, рекомендуемая норма потребления) или *AI** (*Adequate Intake*, адекватное потребление) для мужчин и женщин в возрасте 19–50 лет. По [127–130]. В РФ физиологическая потребность определена методическими рекомендациями МР 2.3.1.2432–08 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации». — *Примеч. ред.*

[b] Для взрослых в возрасте 31–50 лет.

Красное мясо является прекрасным источником железа благодаря высокому содержанию миоглобина, однако он в высоком количестве присутствует также в белом курином мясе и рыбе (см. табл. 16.4). Более того, железо в гемовой форме обладает большей биодоступностью, чем железо из неорганических источников. В мясе также много калия, фосфора и магния, чего нельзя сказать о кальции, который, несмотря на его важность для регулирования сокращения мышц, присутствует в мясе в небольшом количестве относительно норм потребления. В мясе механической обвалки содержание кальция может быть выше из-за его присутствия в составе мелких фрагментов костей [8].

В свежем мясе содержится очень мало углеводов (менее 1%). Основным источником углеводов в мясе служит гликоген, а также минорное содержание моносахаридов и метаболитов гликолиза. В ходе преобразования мышечной ткани в мясо большая часть гликогена, являющимся основным углеводом мяса, при анаэробном гликолизе превращается в молочную кислоту [9].

16.3. Структура и функции мышечных тканей

16.3.1. Структура скелетных мышц

Отдельные скелетные мышцы очень сильно различаются по своим размерам и морфологии. Как правило, они состоят из параллельно расположенных удлиненных многоядерных клеток, которые называют мышечными волокнами. Отдельные мышечные волокна имеют ширину от 10 до 100 мкм, а их длина составляет от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров (иногда на всю длину мышцы). Мышечные волокна вместе с кровью, кровеносными сосудами и нервными волокнами образуют целостный мышеч-

ный орган (рис. 16.1). Каждое мышечное волокно покрыто слоем соединительной ткани, называемой эндомизием. Группы мышечных волокон, организованные в первичные и вторичные пучки, отделены друг от друга еще одним слоем соединительной ткани, который называется перимизием. Вся мышца окружена внешним слоем жесткой соединительной ткани — эпимизием. Соединительная ткань связок прикрепляет мышцы к костям. Молекулярные и структурные свойства соединительной ткани рассмотрены в разделе 16.3.4.1.

Мышечная ткань буквально пронизана сложной системой нервных волокон, управляющих сокращением мышц и мышечным тонусом, а также системой сосудов, по которым кровь доносит до мышечной ткани кислород и питательные вещества, и выводит из нее продукты метаболизма (рис. 16.1). Перимизий и эндомизий обеспечивают поддержание структурной целостности тканей в состоянии покоя и, что еще более важно, при механическом усилии сокращения. В слое перимизия находится также жировая ткань, которую можно видеть в красном мясе в виде белых жировых точек или прожилок («мраморность») на красном фоне мышечных волокон. По количеству таких белых прожилок зачастую визуально оценивают качество мяса [10].

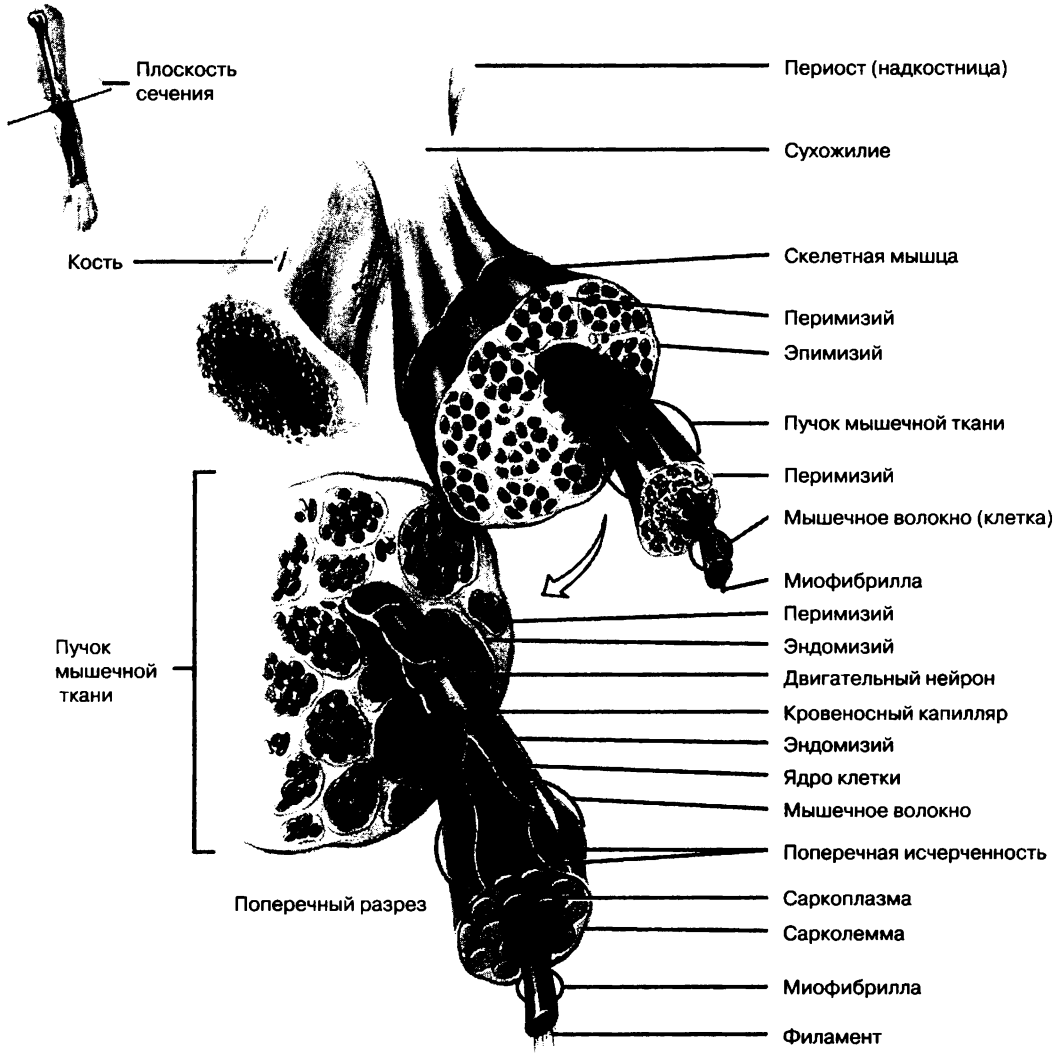


Рис. 16.1. Структуры мышечной ткани (с подклеточного уровня до целого органа). Отдельные мышечные клетки (волокна) окружены слоем соединительной ткани (эндомизием), и образуют пучки, разделенные другим слоем соединительной ткани (перимизием). Кровеносные сосуды и нервные волокна проходят через этот перимизий и поддерживают жизнедеятельность мышц. По [131]

Такая уникальная структура мышечных клеток позволяет преобразовывать электрические сигналы нервной системы в повышение концентрации внутриклеточного кальция, которое вызывает сокращение мышц. Как и все клетки, мышечное волокно окружено плазматической мембраной, называемой сарколеммой (СЛ, рис. 16.2), однако в скелетных мышцах СЛ отличается от плазмолеммы других клеток тем, что она периодически погружается из мембраны внутрь мышечной клетки наподобие поверхности воздушного шарика, вдавливаемой пальцем внутрь. Такое проникновение СЛ вглубь клетки, называемое Т-канальцем или просто канальцем, передает сигнал к действию или деполяризующий сигнал на сокращение от мест примыкания нейронов и мышечной ткани к внутренней части мышечного волокна. Эти Т-канальцы периодически вступают в физический контакт с развитой сетью внутриклеточных мебран, называемой саркоплазматическим ретикулумом (СР), представляющим собой мышечный эквивалент эндоплазматической сети (ретикулума) (рис. 16.2). Эта саркоплазматическая сеть обогащает сокращающиеся органеллы (миофибриллы) и служит резервуаром ионов кальция, включающих механизм сокращения мышц. Многочисленные белки, входящие в состав СР, отвечают за специфические функции регуляторов кальция. Некоторые белки внутри СР связывают ионы кальция, когда мышца находится в состоянии покоя [11], а другие образуют канальцы, открывающиеся в ответ на деполяризующий сигнал, и позволяют ионам кальция диффундировать из СР в саркоплазму, регулируя тем самым сокращение мышц [12]. Другие СР-белки в ходе мышечной релаксации «прокачивают» кальций обратно внутрь СР (их мы рассмотрим в разделе 16.3.4.6).

В мышечных клетках органеллы не такие, как в других клетках. Благодаря своему особому пути развития мышечные волокна скелетных мышц обычно многоядерные (см. рис. 16.2). Эти ядра обычно распределены по периферии клетки и обычно обнаруживаются непосредственно под сарколеммой. Митохондрии обеспечивают синтез АТФ, который используется в качестве источника энергии мышечными волокнами, и присутствуют во всем объеме клетки в тесной ассоциации с миофибриллами. Лизосомы выполняют функцию основного резервуара для протеолитических ферментов, называемых катепсинами, которые являются катализаторами метаболизма белков.

В саркоплазме (цитоплазме) мышечной ткани могут содержаться частицы гликогена и глобулы жира, количество которых зависит от типа мышечной ткани (с метаболизмом на окислительных механизмах или на основе гликолиза), а также от режима питания организма и его состояния (покоя или физической нагрузки). Запасающий кислород белок миоглобин присутствует в саркоплазме в разном количестве, как и различные ферменты (посредники метаболизма) и другие соединения — нуклеотиды, аминокислоты и т. п.

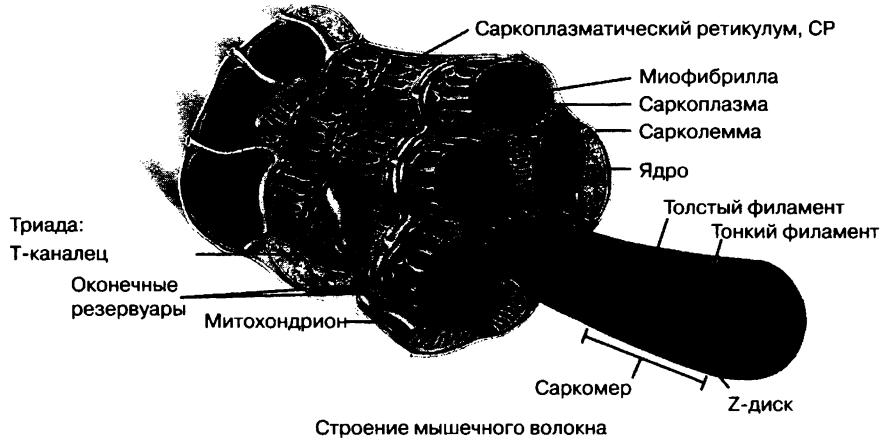


Рис. 16.2. Схематическое представление структуры мышечной ткани. Многоядерные мышечные волокна заключены в оболочку из сарколеммы. При погружении сарколеммы внутрь мышечного волокна образуются структуры Т-канальцев. Каждый такой Т-каналец связан с двумя оконечным резервуарами СР, образуя структуру типа триады. СР представляет собой органеллу, «окутывающую» миофибриллы. В ней хранятся запасы кальция, пока мышца находится в состоянии покоя, а при сокращении мышц ионы кальция высвобождаются. По [131]

Сокращение мышц обусловлено действием специфических белков, организованных в параллельные взаимопроникающие тонкие и толстые филаменты (миофиламенты), составляющие 80–90% объема мышечного волокна. Эти миофиламенты сгруппированы в миофибриллы, действующие скоординированно как соединительные органеллы мышечной клетки. Такая высокая степень структурированности миофибрилл особенно заметна при микроскопическом исследовании продольного разреза скелетной мышцы. При этом можно видеть структуру из чередующихся светлых и темных полос, образованных продольными повторностями основных структурных сократительных элементов, называемых саркомерами (рис. 16.3, *a*). В поляризованном свете видна анизотропная природа темных полос, в связи с чем их называют «А-полосами». Более светлые полосы имеют в поляризованном свете изотропную природу и называются «I-полосами». Границы саркомера определяются структурами, называемыми Z-дисками,

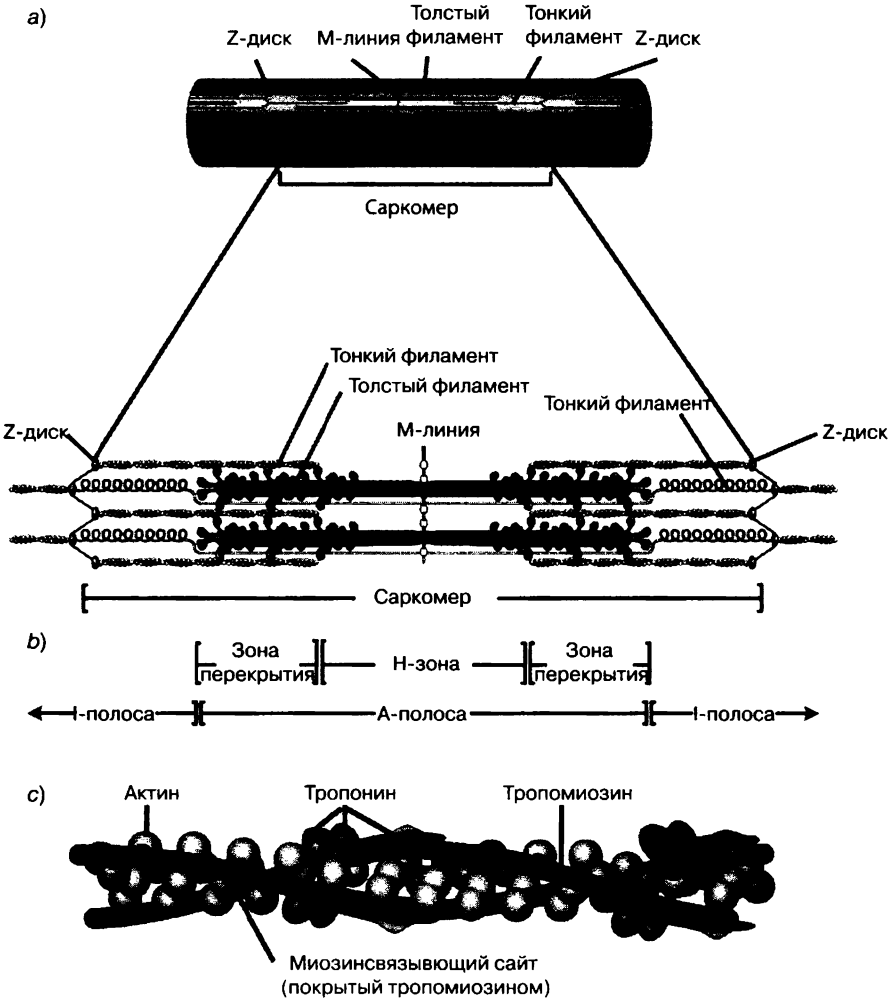


Рис. 16.3. Структура саркомера: *a* — саркомерный элемент миофибриллы, начинающийся с одного Z-диска и оканчивающийся на следующем Z-диске. В центре каждого саркомера находятся упорядоченные белки, образующие срединную линию (М-линию); *b* — основными компонентами саркомера являются тонкие филаменты, закрепленные на Z-диске, толстые филаменты в центральной зоне саркомера, частично перекрывающиеся с тонкими филаментами, а также титиновые филаменты, простирающиеся от Z-диска до М-линии; *c* — актиновые мономеры полимеризуются и образуют двухленточную спиральную структуру, служащую каркасом для тонкого филамента. Тропомиозин полимеризуется по типу «голова-к-хвосту» и располагается вблизи канальца двойной спирали актина, покрывающей миозинсвязывающие сайты актинового каркаса. В одной молекуле тропомиозина содержится семь мономерных молекул актина. Одна молекула тропонина (состоящая из трех субъединиц) связана с одной молекулой тропомиозина с помощью асимметричной субъединицы тропонина-Т. По [131]

представляющими собой узкие темные, насыщенные электронами белки в центре I-полосы. Буква Z в термине «Z-диск» происходит от немецкого слова *zwischen* («между») и указывает на ее положение в центре I-полосы. Белковый матрикс, образующий Z-диск, служит своего рода «якорем» для белков окружающих его тонких филаментов.

Саркомер состоит из чередующихся тонких и толстых филаментов, I-полоса — из тонких, а A-полоса — из перекрывающихся тонких и толстых филаментов. Центральная часть A-полосы несколько менее плотная, чем крайние (дистальные) области, и, следовательно, выглядит светлее, так как эта зона состоит только из толстых филаментов (без их перекрытий с тонкими). Эту полосу называют H-зоной (от немецкого слова *helle* — «светлый»). В центре этой H-зоны находится темный участок, аналогичный Z-диску. Эта структура, называемая M-линией, состоит из белков, поддерживающих структурную упорядоченность белков толстых филаментов, и служит совего родя «якорем» для полипептида титина, простирающегося от M-линии до Z-диска (см. раздел 16.3.4.5).

В 1954 г. была предложена теория мышечного сокращения, получившая название «теория скользящих филаментов» и сохранившаяся практически в неизменном виде до настоящего времени [13]. Эта теория основана на том предположении, что длина толстых и тонких филаментов не меняется и не зависит от степени удлинения или сокращения мышц или нахождения мышцы в состоянии покоя. И наоборот, длина саркомера (расстояние между соседними Z-дисками) варьирует в зависимости от степени сокращения мышечной ткани (силы, приложенной к мышечному волокну). Кроме того, электронные микрофотографии поперечного разреза мышечной ткани свидетельствуют, что тонкие и толстые филаменты взаимодействуют между собой (толстый филамент окружен массивом из шести тонких). Авторы указанной работы предположили, что при сокращении мышцы тонкий и толстый филаменты перемещаются относительно друг друга так, что тонкие филаменты с противоположных концов саркомера двигаются навстречу, что приводит к уменьшению длины саркомера (рис. 16.4). И наоборот, удлинение мышцы является следствием увеличения отделения Z-диска из-за перемещения тонких филаментов саркомера вдоль A-полосы по направлению друг от друга. Большое практическое значение для мягкости мяса имеет степень перекрытия тонких и толстых филаментов. Как будет показано далее в разделе 16.5.3, наблюдается, как правило, отрицательная корреляция между длиной саркомера и жесткостью мяса. При максимальном сокраще-

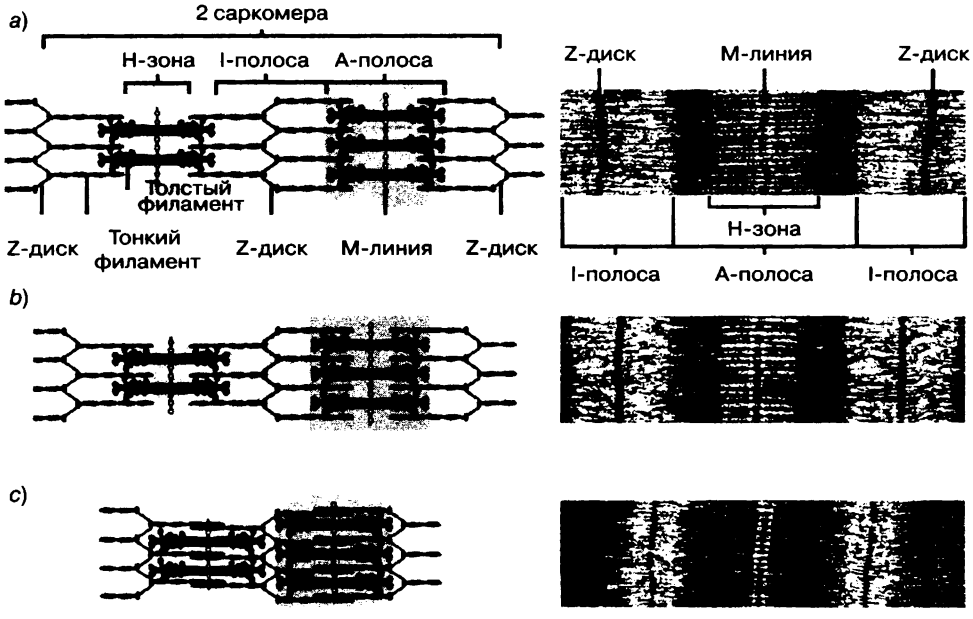


Рис. 16.4. Иллюстрация к теории скольжения филаментов: *a* — состояние покоя; *b* — мышечная ткань в состоянии частичного сокращения: *c* — мышечная ткань в состоянии максимального сокращения. Тонкие и толстые филаменты скользят относительно друг друга. Обратите внимание на сокращение расстояния между Z-дисками по мере сокращения мышцы, а также увеличение перекрытия тонких и толстых филаментов по мере сокращения мышцы. По [131]

нии мышцы длина саркомера минимальна, и высокая степень перекрытия филаментов с большим количеством ригорных зон между двумя типами филаментов увеличивает жесткость мяса. Молекулярные аспекты влияния перемещения филаментов на сокращение мышечной ткани рассматриваются в разделе 16.3.5.

16.3.2. Структура сердечной мышцы

Сердце можно использовать в качестве пищевого продукта непосредственно, но чаще его измельчают и включают в состав других мясных продуктов типа колбас и сосисок. Как и скелетные мышцы, сердечная мышца является поперечно-полосатой, что предполагает упорядоченность сократительных белков, аналогичную скелетным мышцам. С аналитической точки зрения упорядоченность мышечных волокон в сердечной мышце менее регулярна, чем в скелетных мышцах, и в отличие от мультиядерных волокон скелетных мышц сердечная мышца имеет лишь 1–2 центрально расположенных ядра. Хотя сократительные белки сердечной мышцы те же, что и у скелетных мышц, их изоформы зачастую специфичны именно для сердечной мышцы. Отличия функциональных свойств белков скелетной и сердечной мышц обусловлены различиями в последовательности аминокислот. Кроме того, сигнальный механизм возбуждения волокон сердечной мышцы и механизм высвобождения кальция отличается от аналогичных механизмов скелетной мышцы. Все эти факторы имеют большое значение в метаболизме сердечной мышцы *postmortem* («после смерти») и в использовании сердца как пищевого продукта. Подробное рассмотрение этого вопроса выходит за рамки данной главы, и мы отсылаем читателей, желающих получить более подробную информацию, к работам по биологии сердца [14, 15].

16.3.3. Структура гладкой мышечной ткани

Некоторые гладкие мышцы (в частности, желудок и кишки) употребляются в пищу как субпродукты. В отличие от скелетных и сердечных мышечных тканей, гладкие мышцы не относятся к поперечно-полосатым, у которых продольная структура видна под микроскопом, и поэтму они получили название «гладких». Это свойство обусловлено упорядочением сократительных белков в гладкой мышечной ткани, которое относительно неструктурировано. В сокращении гладких мышц участвуют многие белки скелетных мышц, однако некоторые белки отсутствуют, так что у различных гладких мышц и у разных видов животных действуют разные механизмы регулирования мышечных сокращений. Как и в случае сердечной мышцы, даже в присутствии одних и тех же белков (миозина, актина, тропомиозина) экспрессированные изоформы тканеспецифичны и существенно отличаются от изоформ белков скелетных мышц, из-за чего функциональные свойства гладкой мышечной ткани в переработанных мясных продуктах могут существенно отличаться от свойств скелетной мышечной ткани. Подробнее ознакомиться с вопросами физиологии гладких мышц можно в работе [16].

16.3.4. Мышечные белки

Белки скелетных мышц подразделяют в зависимости от их растворимости или биологической функции. В последнем случае виды белков обычно зависят от их роли в структуре мышечной ткани, ее сокращении, метаболизме и т. п. Разделение белков по растворимости на три основных класса традиционно обусловлено их различной солюбилизацией при разных концентрациях солей (или разной ионной силы раствора). Как правило, эти классы коррелируют с локализацией белков в клетке. Выделяют саркоплазматические, миофибриллярные белки и белки стромы.

Как следует из их названия, к саркоплазматическим белкам относят белки, входящие в состав саркоплазмы мышечных волокон, — гликолитические ферменты, миоглобин и другие ферменты, участвующие в метаболизме. Иногда такие белки называют «водорастворимыми» благодаря их растворимости в воде при низких уровнях ионизации ионной силы раствора (с концентрацией солей > 0,3 мМ). Эта белковая фракция составляет около 30% всех мышечных белков [17].

Миофибриллярные белки составляют самую крупную фракцию (50–60%) мышечных белков. Для растворения этих белков неободимы высокие концентрации солей (например, более 0,3 М NaCl). Из-за этого их иногда называют «солерастворимой» фракцией мышечных белков. Концентрация солей в мышечной

ткани составляет примерно 0,15 М, то есть она достаточно низка для предупреждения растворения этих белков в саркоплазме и поддержания четвертичной структуры филаментов мышечной ткани.

Основные компоненты толстых и тонких филаментов — миозин и актин — составляют около 65% всех миофибриллярных белков и около 40% общего мышечного белка [18] (см. рис. 16.3, *а*). Химическое поведение этих двух белков в солевых растворах обусловливает растворимость этой группы белков и изменения в переработанных мясных продуктах. Следует отметить, что хотя миофибриллярные белки обычно характеризуются высокой растворимостью в растворах с высоким содержанием солей, это является своего рода обобщением. Например, в некоторых случаях солюбилизация миофибриллярных белков трески наблюдалась при очень низкой ионной силе (менее 0,0002) [19]. Кроме того, при очень низкой ионной силе растворимы и другие миофибриллярные белки, в частности очищенный тропониновый комплекс.

Качественные показатели свежих мясных продуктов в большой степени определяются высоким содержанием и составом белков стромы, образующих 10–20% общего мышечного белка. Содержание этих белков варьирует в зависимости от вида животных, их возраста и типа мышечной ткани [20]. Как правило, эти белки нерастворимы в обычных условиях экстракции, то есть при значениях pH, близких к нейтральному, при низком и высоком содержании солей, а также при низких температурах. Доминирующим среди белков стромы является коллаген, наиболее распространенный белок в организме человека. Белки стромы образуют слои рассматривавшейся ранее соединительной ткани, которая упрочняет и защищает мышечную ткань, в связи с чем может существовать корреляция между количеством и качеством коллагена и жесткостью мяса [21]. Кроме того, молекулы коллагена ковалентно сшиты (см. далее), и чем старше животное, тем больше образуется сшивок [22]. Значение коллагена для качества мяса будет еще более понятно, если учесть тот факт, что различные способы переработки и кулинарной обработки мяса направлены именно на то, чтобы разрушить и частично растворить коллагеновые волокна и сделать мясо более мягким [23].

16.3.4.1. Белки соединительной ткани и белковая матрица

Ка мы уже отмечали, соединительная ткань присутствует в мышечной ткани в формах эпимизия, перимизия и эндомизия, структура которых образует прочный матрикс, необходимый для поддержания мышечных функций и обеспечения определенной степени эластичности [24]. Соединительная ткань состоит из разных типов клеток, в том числе фибробластов, синтезирующих коллаген, макрофагов, лимфоидных клеток, тучных клеток и эозинофилов. В ней также присутствует внеклеточный матрикс, состоящий из мышечных и немышечных белков, в том числе коллагенов, эластина и протеогликанов. Вплоть до недавнего времени считалось, что главная роль внеклеточного материкса состоит в поддержании структурной целостности мышечной ткани, однако начиная с середины 1990-х гг стало ясно, что этот внеклеточный матрикс играет ключевую роль в регулировании поведения окружащих клеток [25], передавая клеткам информацию через входящие в состав плазматических мембран рецепторы-интегрины (рис. 16.5). Интегрины служат своего рода соедительными звеньями между внутриклеточной цитоскелетной сетью и внеклеточным матриксом [26]. С помощью интегринов внеклеточный матрикс регулирует и модулирует различные виды активности, в том числе экспрессию генов, миграцию, адгезию, пролиферацию и дифференциацию. Дифференциация скелетных мышц полностью зависит от синтеза протеогликанов [27], а типы экспрессированных протеогликанов меняются в зависимости от стадии развития [28]. Более того, высказывается предположение, что снижение экспрессии белков внеклеточного матрикса [29], а также деградация интегринов *postmortem* может оказывать влияние на увеличение потерь тканевого («мясного») сока, сказывающегося на ухудшении качества мяса [30].

Доминирующим белком соединительной ткания является коллаген. Понятие «коллаген» относится к семейству из не менее 27 различных изоформ белков, присутствующих в соединительных тканях организма (в костях, связках, хрящах, кровеносных сосудах, коже, зубах, а также в соедительных тканях мышц) [31]. Коллаген играет большую роль в обеспечении прочности мышечных тканей млекопитающих, а в полуочищенной форме служит важным функциональным ингредиентом пищевых продуктов, в частности желатина. Скелетные мышцы небольших животных и рыб несут меньшую нагрузку и обычно содержат меньше коллагена и меньше сшивок, чем у крупных наземных животных. Этим обусловлена и более мягкая текстура мяса небольших животных и рыбы.

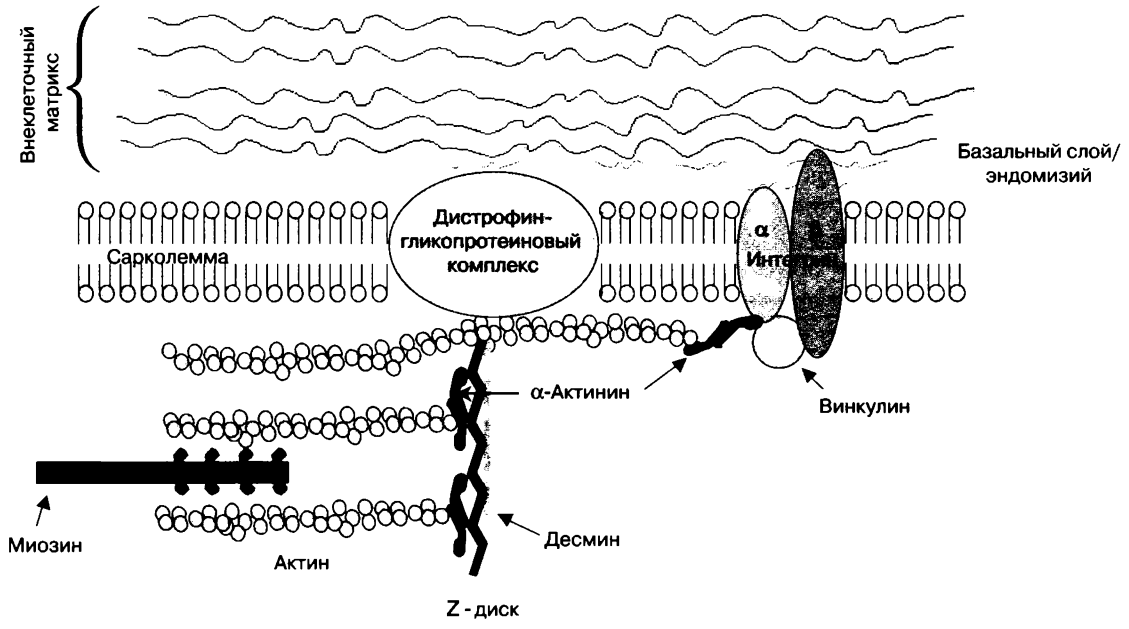


Рис. 16.5. Схематическое представление локализации и взаимодействия белков внеклеточного матрикса с сетью внутриклеточных цитоскелетных белков. Белки внеклеточного матрикса связываются с внутриклеточными цитоскелетными белками с помощью интегринового комплекса, входящего в состав сарколеммы. По [26]

Все коллагены разделяют по образуемой ими надмолекулярной структуре. Отдельные группы включают (1) волокнистые (поперечно-полосатые); (2) неволокнистые, сетеобразующие; (3) микрофибриллярные или филаментные, а также (4) фибрилло-ассоциированные. Далее мы рассмотрим несколько примеров коллагенов мышечных тканей.

Коллагены I, III и V типа относятся к семейству волокнистых (поперечно-полосатых) коллагенов. Их анализ под электронным микроскопом позволяет выявить повторяющиеся через каждые 64–70 нм полоски, образованные расположенными рядом скоплениями молекул коллагена (рис. 16.6). Эти три типа коллагена ассоциируются с эпимизием, состоящим только из коллагена типа I, и перимизием, в состав которого входят коллагены типа I и III, и некоторые коллагены типа V [32]. В ряде более старых работ под названием ретикулин выделялась термостойкая фракция белков стромы, образующих волокна, ассоциируемые с перимизием. В настоящее время уже ясно, что эти волокна образованы коллагеновыми волокнами типа III, избыток которых обусловливает жесткость мяса [33]. Эндомизий состоит в основном из коллагена типа IV, относящегося к группе сетеобразующих коллагенов [32]. В отличие от волокнистых, коллагены типа IV образуют листоподобную сеточную структуру, напоминающую структуру сетки «рабица». Такая структура возникает из-за различий в последовательности аминокислот, что препятствует ассоциированию соседних молекул и характерно для волокнистого семейства коллагенов. С эндомизием ассоциированы также небольшие количества коллагенов типов I, III и V.

Основное звено коллагена называется тропоколлагеном и состоит из трех полипептидных звеньев, переплетных вокруг друг друга в виде суперспирали и образующих линейную молекулу длиной около 280 нм и шириной 1,4–1,5 нм (рис. 16.7). Эти звенья могут иметь одинаковую или различную последовательность аминокислот в зависимости от типа коллагена. Например, коллаген типа I состоит из двух одинаковых полипептидных звеньев, обозначаемых α1(I), и одного звена с другой последовательностью аминокислот, обозначаемого α2(I). Коллаген типа III состоит из трех одинаковых звеньев α1(III). Принято обозначать различные звенья данного типа коллагена арабскими цифрами, а римскими цифрами — принадлежность к конкретному типу коллагена. Соответственно α1-звенья коллагена типа I отличаются от α1-звеньев коллагена типа II.

В коллагене первого типа полипептидное звено в среднем состоит примерно из 1000 аминокислотных остатков, причем характерная повторяющаяся последовательность в большинстве звеньев — это (*Gly–*

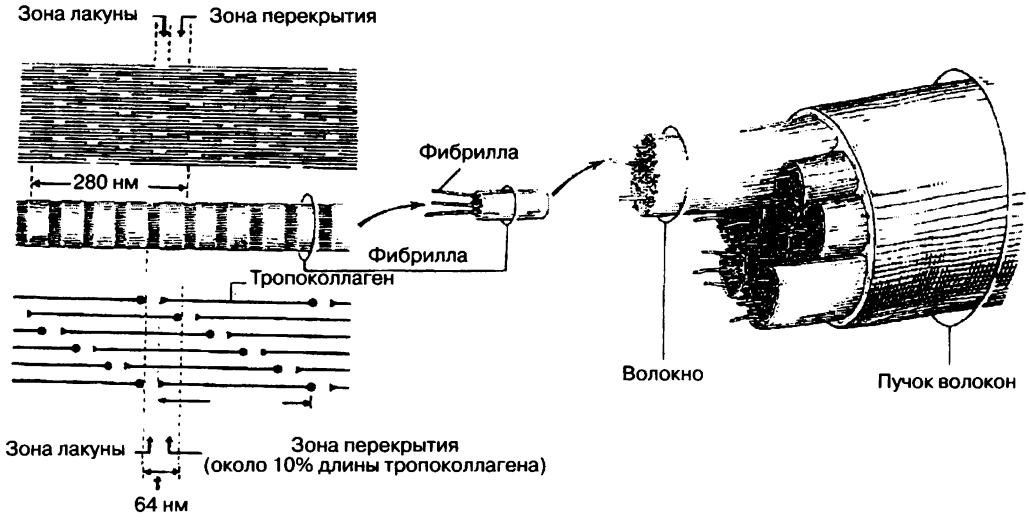


Рис. 16.6. Образование коллагеновых фибрил. Тропоколлагеновые звенья образуют линейные массивы с соседними молекулами посредством перекрытия «голова-к-хвосту». Возникшие в этом линейном массиве тропоколлагеновых звеньев зазоры и перекрытия обусловливают появление светлых (лакун) и темных (перекрывающихся) зон. Коллагеновые фибриллы окружают мышечные волокна, их пучки и мышцы в целом. По [132]

$X–Y)_n$. В этой последовательности X часто представлен пролином, а Y — гидроксипролином или гидроксилизином. Последние аминокислоты образуются в ходе посттрансляционного гидроксилирования пролина и лизина соответственно пролилгидроксидазой и лизилгидроксилазой. Как правило, коллагены состоят примерно из 33% глицина, 12% пролина, 11% аланина, 10% гидроксипролина, 1% гидроксилизина и небольшого количества полярных аминокислот, несущих электрический заряд. Триптофан в коллагене отсутствует, что иногда используется для проверки чистоты коллагеновых препаратов. В связи с доминированием указанных выше и отсутствием большинства эссенциальных аминокислот коллаген является плохим источником белка в рационе.

Характерная последовательность аминокислот в коллагене определяет «упаковку» коллагенового семейства белков. После глицина в начале каждого триплета зачастую следует остаток пролина, что приводит к образованию очень протяженной полипептидной α-цепи, образующей уникальную плоскую, закрученную влево спираль (геликс). В коллагене первого типа три α-цепи образуют закрученную вправо трехспиральную структуру молекулы тропоколлагена (см. рис. 16.7). Из данных исследований структуры

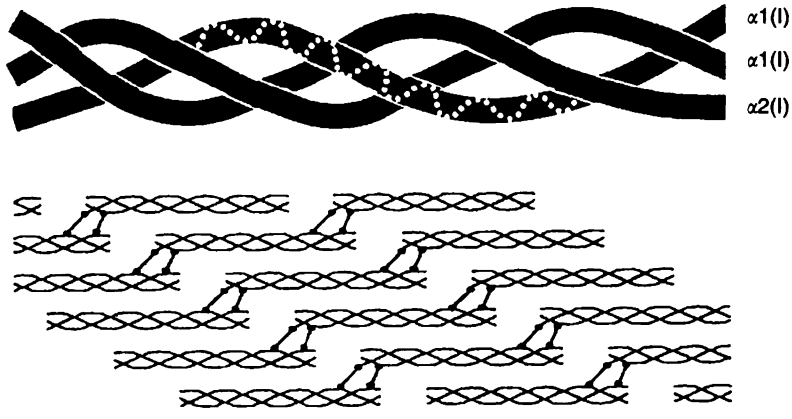


Рис. 16.7. Схематическое представление тропоколлагеновой тройной спирали и сшивки молекул тропоколлагена в коллагеновой фибрилле. По [133]

коллагена следует, что боковые звенья каждого глицинового остатка, то есть атомы водорода, направлены к центру этой спиралевидной структуры. Благодаря меньшему размеру атома водорода по сравнению с другими боковыми звеньями аминокислот, глицин является единственной аминокислотой, у которой так расположены боковые звенья. Более того, каждое звено по отношению к двум другим располагается в шахматном порядке, что позволяет иметь водородные связи между водородом полипептидного амида глицинового остатка и карбонильным кислородом соседнего X-остатка другого звена. Довольно частое присутстве пролина и гидроксипролина в данной последовательности не дает этой структуре принять форму классической α-спирали, поскольку существуют ограничения по допустимым ϕ- и ψ-углам этих остатков. Более того, у них не хватает амидных атомов водорода, обычно участвующих в стабилизации α-спиралей. Гидроксильные группппы гидроксипролина и гидроксилизина также стабизируются с помощью межзвенных водородных связей. Тем самым вторичная структура коллагена отличается от других белков своей характерной, необычно протяженной и относительно жесткой спиралью [34].

Коллагеновые полипептиды синтезируются в виде предшественников (прекурсоров), называемых про-α-звеньями. Эти предшественники полипептидов включают N-терминальную сигнальную последовательность, направляющую данный полипептид в просвет эндоплазматического ретикула фибробласта. Таким образом, эта сигнальная последовательность на N- и C- терминальном концах представляет собой последовательность дополнительных остатков, которые совокупно называются полипептидами. После попадания полипептида в просвет эндоплазматического ретикула, соответствующие пролиновые и лизиновые остатки гидроксилируются, а небольшое количество гидроксилизиновых остатков гликозилируются. Про-α-звенья затем связываются и образуют трехспиральную молекулу проколлагена. Считается, что эти пропептидные последовательности инициируют образование молекулы проколлагена и ингибируют образование в клетке крупных, трудно секретируемых фибрилл [25].

Проколлаген секретируется во внеклеточный матрикс, где эти полипептиды отщепляются с двух концов молекулы протеиназами с образованием тропоколлагена, который затем начинает образовывать фибриллы с другими молекулами тропоколлагена. Молекулы тропоколлагена собираются в упорядоченный массив путем бокового ассоциирования и стабилизируются преимущественно с помощью гидрофобных и электростатических взаимодействий. 14 N-концевых и 10 C-концевых остатков тропоколлагена не проявляют свойств последовательности *Gly–X–Y*, характерной для большинства молекул тропоколлагена, и поэтому эти телопептидные участки не образуют характерную коллагеновую спираль.

Эти телопептидные участки участвуют в образовании ковалентных межмолекулярных сшивок (см. рис. 16.7), обеспечивающих необходимую стабильность и прочность на растяжение данной супрамолекулярной структуры. В начальной сшивке тропоколлагеновых звеньев участвуют четыре остатка: два лизиновых или гидроксилизиновых из N-концевых телопептидов и два лизиновых или гидроксилизиновых из C-концевых телопептидов. Упорядочивание молекул тропоколлагена по принципу «голова-к-хвосту» позволяет N-концевым телопептидам взаимодействать с соседними C-концевыми телопептидами.

Перед сшивкой должно пройти окислительное дезаминирование лизиновых или гидроксилизиновых остатков с образованием соответственно аллизина или гидроксиаллилизина под действием фермента лизилоксидазы. Последущие реакции сшивки происходят спонтанно путем альдольной конденсации или образования промежуточных продуктов в виде основания Шиффа вследствие конденсации лизиновых или гидроксилизиновых аминогрупп с альдегидом аллизина или гидроксиаллизина. Некоторые примеры этих реакций сшивки представлены на рис. 16.8. Образованные по этим путям двухвалентные сшивки редуцируются борогидридом, из-за чего их называют «редуцируемыми сшивками».

По мере взросления животного эти двухвалентные редуцируемые сшивки преобразуются в более стабильные нередуцируемые трехвалентные сшивки. Описаны два типа таких сшивок: гидроксилизилпиридинолиновые (ГП) и лизилпиридинолиновые (ЛП) (рис. 16.9), причем последние присутствуют в мышечной ткани в незначительном количестве. ГП-сшивки, судя по всему, образованы путем конденсации двух кетоаминных сшивок (см. рис. 16.8), что подтверждается одновременным стехиометрическим исчезновением редуцируемых сшивок и образованием их нередуцируемых форм [21]. В отличие от редуцируемых сшивок, нередуцируемые характеризуется высокой термостойкостью, что важно для мягкости мяса. Более того, дополнительные сшивки, образующиеся по мере взросления животного, вносят свой вклад в увеличение жесткости мяса, характерной для старых животных [21, 35].

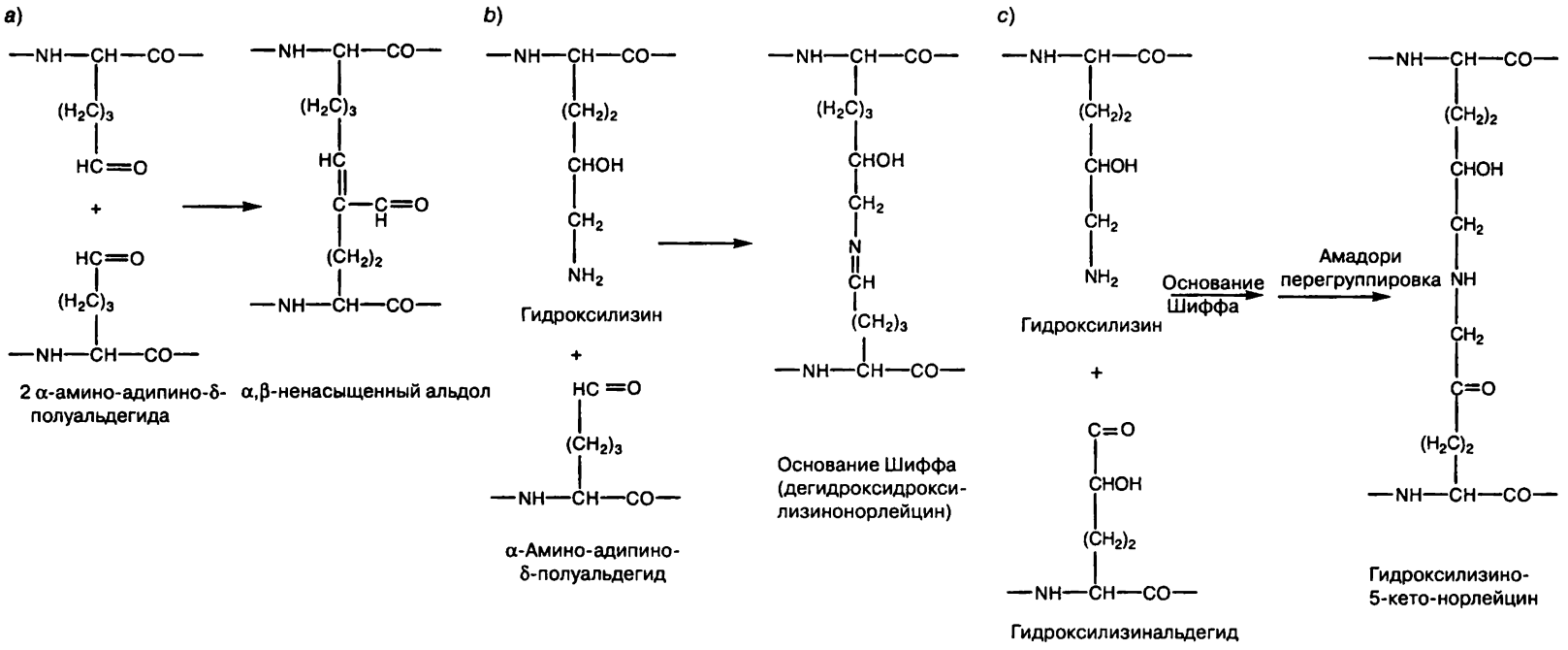


Рис. 16.8. Механизмы сшивки боковых звеньев коллагена: *a* — альдольная кондесация двух аллизиновых остатков сопровождается потерей молекулы воды; *b* — после образования основания Шиффа следует конденсация гидроксилизина с аллизином; *c* — после образования основания Шиффа следует конденсация гидроксилизина и гидроксиаллизина. Промежуточный продукт в виде основания Шиффа обусловливает перегруппировку Амадори с образованием гидроксилизино-5-кето-норлейцина. По [126]

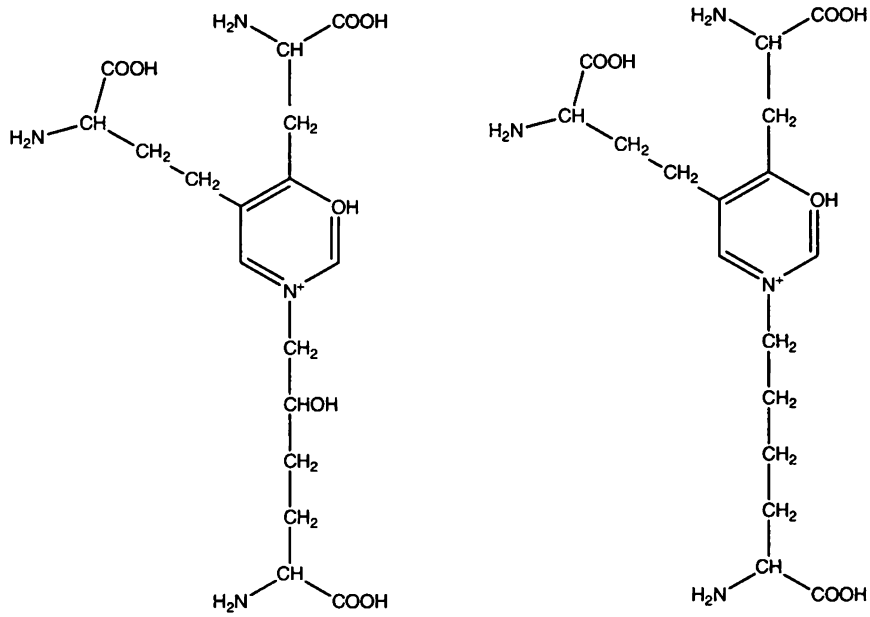


Рис. 16.9. Структурные формулы гидроксилизилпиридинолиновых (ГП) и лизилпиридинолиновых (ЛП) сшивок коллагена

Количество сшивок варьирует не только в зависимости от возраста животного, но и от функции мышечной ткани (опорной или двигательной), вида животного, степени физических нагрузок и применения гормонов (промоторов) роста. Кроме того, поскольку и содержание коллагена, и степень сшивки коррелируют с жесткостью мяса, наблюдается их аддитивный эффект. В менее жестких мышечных тканях (например, в *biceps femoris* в говядине) концентрация коллагена и ГП высока, тогда как в относительно более мягких тканях (например, в *longissimus dorsi*) содержится лишь от половины до двух третей от количества коллагена и ГП в *biceps femoris*. Кроме того, в мышце *gluteus medius* коллагена много, а ГП мало, тогда как в мышце *pectoralis major* мало коллагена и много ГП. Обе эти мышечные ткани являются относительно мягкими, так что жесткость мяса строго коррелирует с вышеупомянутым аддитивным эффектом двух компонентов коллагена [21].

16.3.4.2. Саркоплазматические белки

Саркоплазматические белки, как следует из их названия, сосредоточены в саркоплазме (цитоплазме) мышечной клетки и присутствуют в довольно большом количестве, составляя 25–30% общего мышечного белка [17]. Многие, но не все такие белки представляют собой ферменты, участвующие в гликолизе и синтезе гликогена, а также в гликогенолизе (табл. 16.5). Около 20% саркоплазматических белков приходится на один фермент, а именно глицеральдегидфосфатдегидрогеназу. Более 50% всех саркоплазматических белков относятся к этому ферменту, а также еще к 4–5 гликолитическим ферментам. К другим белкам относятся ферменты пентозного шунта и вспогательные ферменты типа креатинкиназы (растворимая фракция), АМФ-дезаминазы, кальпаины, белок, запасающий кислород, и миоглобин.

Количество тех или иных белков в саркоплазме существенно варьирует в зависимости от вида и породы животных, от типа мышечной ткани, возраста и индивидуальных генетических особенностей животного. Например, содержание миоглобина у молодых бычков, как правило, ниже, что обусловливает более бледный цвет их мяса по сравнению с говядиной от более взрослых животных. Мышечные ткани птичьих грудок и многие мышечные ткани рыбы менее красные именно из-за низкого содержания миоглобина, тогда куриные ножки и бедрышки имеют более интенсивную окраску, чем мясо грудки, так как в них миоглобина больше. Самый высокий уровень миоглобина характерен для китового мяса — в нем миоглобин составляет 70% всех саркоплазматических белков [17].

Таблица 16.5
Преобладающие саркоплазматические белки мышечных тканей. По [17]

Белок	Содержание, мг/г мышечной ткани
Фосфорилаза В	2,5
Фосфоглюкомитаза	1,5
Фосфоглюкозоизомераза	1,0
Фосфофруктокиназа	1,0
Альдолаза	6,0
Триозофосфатизомераза	2,0
α-Глицерофосфатдегидрогеназа	0,5
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	12
Фосфоглицераткиназа	1,2
Фосфоглицератмутаза	1,0
Енолаза	5
Пируваткиназа	3
Лактатдегидрогеназа	4
Креатинкиназа	5
Аденилаткиназа	0,5
АМФ-дезаминаза	0,2
Миоглобин	0,5–2,0

Еще одним важным ферментом как для живых мышечных тканей, так и для их посмертных изменений является креатинкиназа. Этот фермент присутствует во фракции растворимых саркоплазматических белков, а также в виде компонента белкового матрикса М-линии в миофибрилле. Креатинкиназа поддерживает стабильность содержания АТФ, необходимого мышцам при высоких энергетических затратах, в частности при быстром беге и поднятии тяжестей [36]. Расходование АТФ в этих условиях идет обычно значительно быстрее, чем его синтез благодаря процессам гликолиза и окислительнооого метаболизма. В этих условиях, креатинфосфат (КрФ) является соединением-накопителем энергии, из которого фосфат передается АДФ для синтеза АТФ в ходе реакции, катализируемой креатинкиназой:

$$КрФ + MgАДФ \rightarrow MgАТФ + Кр.$$

В мышечной ткани в состоянии покоя, когда уровень АТФ восстанавливается в ходе гликолиза и окислительного метаболизма, вышеприведенная реакция протекает в обратном направлении, и в результате значительная часть энергии запасается в виде резервной формы КрФ.

Еще два заслуживающих упоминания саркоплазматических белка — это аденилаткиназа и АМФ-дезаминаза. Если АТФ утилизируется для обеспечения клетки энергией, то АДФ преобразуется обратно в АТФ во время процессов гликолиза, окислительно фосфорилирования или с помощью креатинкиназы. Аденилаткиназа также поддерживает обеспечение клетки энергией путем синтеза АТФ по следующей реакции:

$$2АДФ \rightarrow АТФ + АМФ.$$

В периоды интенсивного энергопотребления мышечной тканью, а также на ранней стадии ее посмертных преобразований уровень АТФ быстро снижается. Эта реакция особенно важна при истощении иных источников АТФ. Еще один продукт вышеприведенной реакции, АМФ, дезаминируется под действием АМФ-дезаминазы до инозинмонофосфата (ИМФ) по следующей реакации:

$$АМФ \rightarrow ИМФ + NH_3.$$

ИМФ затем расщепляется на гипоксантин, обладающий горьким побочным привкусом (гипоксантин традиционно считается биохимическим индикатором длительности пребывания свежей мышечной ткани рыбы в посмертном состянии).

И наконец, в саркоплазме мышечной ткани присутствуют несколько протеиназ, которые, судя по всему, участвуют в процессе роста мышечной ткани и посмертном расщеплении мышечных белков. Роль этих ферментов в созревании и тендеризации мяса рассматривается в разделе 16.4.1. Другая группа белков не растворима в саркоплазме мышечной ткани, но быстро солюбилизируется при использовании различных способов экстракции. К этим белкам относятся некоторые представители промежуточных и микрофиламентов, образующих в мышечной ткани цитоскелетную белковую сеть.

16.3.4.3. Сократительные белки

16.3.4.3.1. Миозин

Белок миозин служит своего рода молекулярным двигателем мышечного сокращения и является доминирующим белком А-полосы, составляя 45% белков миофибрилл, то есть это преобладающий белок скелетных мышц [18]. Молекула миозина состоит из щести подъединиц: двух «тяжелых» цепочек M_r молекулярной массой около 220 000 и четырех «легких», молекулярная масса которых составляет от 16 000 до 20 000 [37]. Эти шесть субъединиц образуют четвертичную структуру с молекулярной массой около 500 000, обычно выглядящей как две округлые головки, выступающие с конца «палочки» (рис. 16.10, *а*). N-конец каждой тяжелой цепочки сложен в структуру, называемую миозиновой головкой, а С-концевые звенья (60% остатков) образуют переплетенную последовательность длинной α-спирали. Спирали этих двух тяжелых цепочек переплетены в палочкоподобную плеть. Две легкие миозиновые цепи связаны с каждой миозиновой головкой и состоят из двух полипептидов, экстрагируемых в щелочном растворе и обозначаемых соответственно *light chain* 1 (*LC*1, M_r ~ 20 900) и *light chain* 3 (*LC*3, M_r ~ 16 600). Легкую миозиновую цепь 2 иногда называют (5,5′-дитиобис)-2-нитробензойнокислотной (*DTNB*)-цепью, так как обработка миозина этой *DTNB*-кислотой удаляет этот белок (M_r ~ 18 000) из миозиновой головки. В каждой миозиновой головке содержится одна легкая цепь, экстрагируемая в щелочной раствор, и одна легкая *DTNB*-цепь. Последнюю иногда называют регуляторной цепью, поскольку она необходимоа для миозиновой регуляции мышечных сокращений у моллюсков и гладких мышц высших ороанизмов. Аналогичным образом *LC*1 и *LC*3 иногда называют эссенциальными легкими цепями.

«Головки» и «палочка» выполняют совершенно разные функции. В физиологических условиях молекулы миозина объединяются в упорядоченные близлежащие ассоциации палочкоподобных участков каждой молекулы (рис. 16.10, *b*). Тем самым палочкоподобный участок обеспечивает структурную основу для образования толстого филамента. Эти толстые филаменты биполярно упорядочены так, что началом филамента служит М-линия, а миозиновые молекулы располагаются в направлении от нее. От пучка каждого толстого филамента миозиновые головки отходят радиально в направлении тонких филаментов (рис. 16.10, *с*). Верхушка миозиновой головки связана с актином, каркасным белком тонкого филамента. Кроме того, миозиновая головка содержит АТФ-связывающий сайт, служащий своего рода молекулярным приводом мышечного сокращения.

Изучение функциональной природы различных участков миозина облегчилось после обнаружения того факта, что краткая ферментная обработка миозина трипсином или папаином делает фрагменты этого белка более пригодными для исследования в физиологических условиях [38]. Были получены два первичных продукта такого ограниченного протеолиза. Один фрагмент, названный тяжелым меромиозином (ТММ), состоит из двух миозиновых головок и короткого участка отходящей от них миозиновой «палочки». В ТММ сохраняется актиносвязывающая и АТФ-гидролитическая активность исходной молекулы миозина. Оставшийся участок «палочки» назвали легким меромиозином (ЛММ), в котором сохраняется детерминанты молекулярной группировки, позволяющие отдельным молекулам миозина образовывать толстые филаменты. Впоследствии было показано, что дальнейшая протеолитическая обработка ТММ приводит к расщеплению в месте соединения головы и хвоста с образованием двух продуктов. Один из них, состоящий из миозиновой головки, был назван субъединицей 1 (*S*1), а короткий участок хвоста — субъединицей 2 (*S*2, рис 16.10, *а*). Последний не обладал ни свойствами самогруппировки, ни молекулярной двигательной активностью родительской молекулы, то есть он, по-видимомому, служит промежуточным сегментом, отделяющим головку от пучка толстого филамента [39].

Кристаллизация субъединицы 1 позволила определить при высоком разрешении ее молекулярную структуру [40] с двумя характерными углублениями. Один из таких «карманов» выполняет функции АТФ-

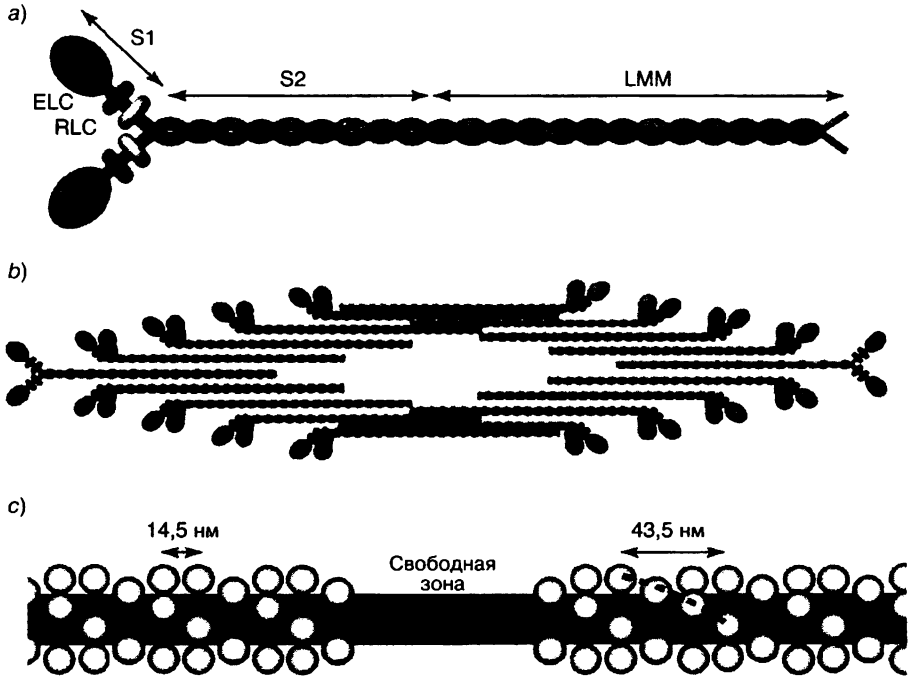


Рис. 16.10. Схематическое представление структуры молекулы миозина и ее «упаковки» в толстые филаменты: *a* — функциональная молекула миозина состоит из двух «тяжелых» цепей, каждая из которых образует округлую головку, и палочкоподобной α-спирали. Эти спирали двух тяжелых цепей далее образуют удлиненную плеть. Две «легике» цепи связаны с областью «шейки» каждой тяжелой цепи. Эссенциальные легкие цепи (*ELC*) обозначают *LC*1 и *LC*3, а регуляторную легкую цепь (*RLC*) — *LC*2. В результате ограниченного протеолиза миозина получается тяжелый (*HMM*) и легкий (*LMM*) меромиозин, а также два субфрагмента HMM — субфрагмент 1 (*S*l) состоит из головки и области шейки *HMM*, а субфрагмент 2 (*S*2) служит связующим звеном между головкой миозина и частью палочкоподобной структуры, участвующим в образовании филамента; *b* — молекулы миозина группируются в биполярные упорядоченные массивы для образования филаментов; *c* — миозиновые головки выступают из толстого филаментного пуска в виде спирали. Соседние молекулы миозина расположены друг от друга на расстоянии 14,5 нм, а миозиновые головки соседних параллельных цепей — на расстоянии 43,5 нм. По [134]

связывающего сайта, а второй — актинсвязывающего (рис. 16.11). Эти две функции составляют важнейшие признаки сократительной активности молекулы миозина. Кроме того, в структуре присутствует удлиненный α-спиральный сегмент, соединяющий головку (*S*1) с палочкой (*S*2). Эта спираль выполняет функции «рычага» для конфомационных изменений при движении головки миозина в ходе мышечных сокращений.

16.3.4.3.2. Актин

Вторым по содержанию миофибриллярным белком мышечной ткани (примерно 20%) является актин. Мономер актина, называемый глобулярным или *G*-актином, представляет собой удлиненную полипептидную цепочку молекулярной массой 42 000 с одним сайтом связывания «аденин–нуклеотид». Термин «*G*-актин» восходит к представлению о почти сферической форме этого мономера, однако после появления снимков его кристаллической структуры с высоким разрешением стало ясно, что форма этой молекулы на самом деле похожа на орех арахиса с двумя крупными областями, разделенным еще на две подобласти [41]. Несмотря на это, для описания мономера актина по-прежнему используют термин «*G*-актин».

G-актин остается мономером даже при очень низкой ионной силе раствора, однако при значениях ионной силы, близких к физиологическим, и в присутствии MgATФ актин полимеризуется по типу «голова-к-хвосту» и образует тонкие закрученные в спираль двухразветвленные филаменты, которые называют филаментным или *F*-актином [42]. Один конец каждого филамента крепится к Z-диску, и филаменты идут к М-линии, расположенной в центре саркомера (см. рис. 16.3, *a*). Благодаря равнонаправленной при-

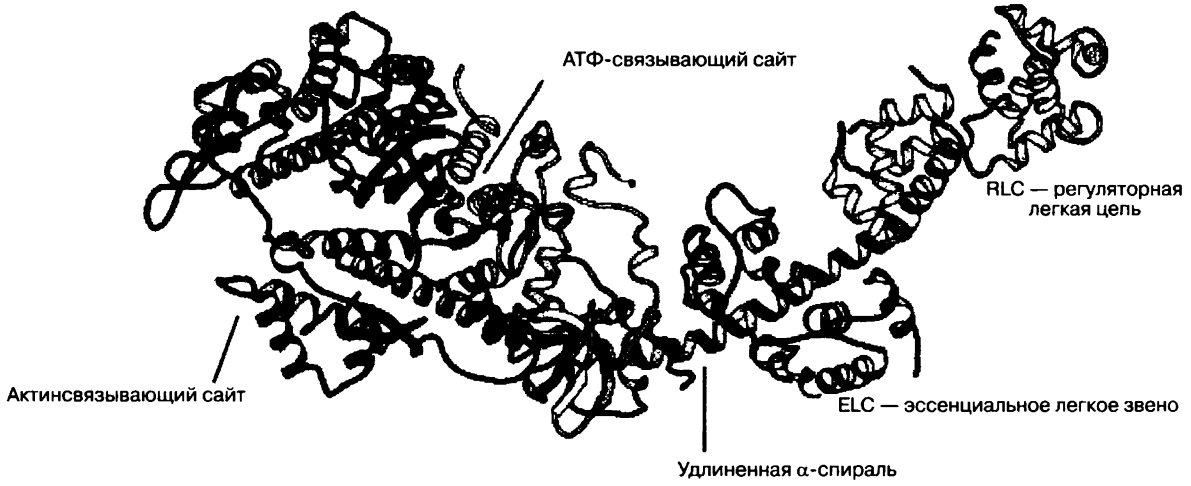


Рис. 16.11. Трехмерное представление структуры миозиновой субъединицы 1. В миозиновой головке можно заметить два «кармана»: актинсвязывающий сайт, служащий участком для образования мостиков, и нуклеотидсвязывающий сайт, где АТФ подвергается гидролизу с выделением энергии для мышечных сокращений. На представленной структуре можно отметить и удлиненную α-спираль, служащую для связывания легких звеньев и выполняющую функцию «рычага» для конформационных изменений миозина при сокращении и релаксации мышечной ткани. По [40]

роде этих тонких филаментов, филаменты актина с противоположных сторон М-линии направлены друг к другу, словно стрелы внутри саркомера. Длина тонких филаментов постоянна и составляет примерно 1 мкм. Считается, что ключевую роль в регулировании размеров отдельных тонких филаментов играют другие белки, а именно небулин, тропомодулин и кэпирующий белок *CapZ* [37].

В миофибрилле актин играет двоякую роль. При сокращении мышц он связывает миозин, образуя актомиозиновые мостики между двумя филаментами. Это связывание актина активизирует АТФазу миозина и заставляет миозин действовать как своего рода «молекулярный двигатель», выдвигая тонкие филаменты за толстые и сокращая саркомер. Вторая его роль заключается в том, что актин образует каркас для связывания тропомиозина и тропонина — белков, которые совместно регулируют актин-миозиновые взаимодействия как реакцию на изменение на уровень кальция.

16.3.4.4. Регуляторные белки

16.3.4.4.1. Тропомиозин

Тропомиозин совместно с тропонином составляют своего рода «переключатель», «включающий» и «выключающий» контрактуру мышцы в данном саркомере [43]. Тропомиозин состоит из двух α-геликальных субъединиц (M_r — около 37 000 Да), переплетенных в длинном палочкоподобном спиральном белке молекулярной массой около 74 000 Да. В скелетной мышечой ткани обнаружены две различных тропомиозиновых подъединицы, называемых α- и β-тропомиозином. Эти подъединицы могут комбинироваться самыми разными способами, образуя гомо- (αα или ββ) или гетеродимеры (αβ) [44]. Фактическое количество каждой изоформы в мышечной ткани зависит от типа ткани («быстрой» или «меленной»), типа мышцы (скелетная, сердечная или гладкая), стадии развития и вида животного. Более того, различные модели сращения тропомиозина дают дополнительные изоформы, которые, как предполагают, обеспечивают дополнительное усиление сократительных свойств разных типов мышечной ткани [44].

Тропомиозин подобно актину полимеризуется при значениях ионной силы, близких к физиологическим, по типу «голова-к-хвосту» с небольшим «нахлестом» из 8–11 аминокислот с каждого конца молекулы тропомиозина. Молекула тропопомиозина имеет длину примерно 42 нм и «захватывает» семь мономерных звеньев актина (см. рис. 16.3, *c*). Филаментная цепь тропомиозина присоединена к актиновому каркасу в специфических сайтах вдоль каждого актинового мономера, вблизи «канавок» двойной спирали тонкого филамента. Когда мышца находится в состоянии покоя, тропомиозин в этой позиции блокирует сайты связвания миозина во внешней области актинового филамента [44].

16.3.4.4.2.Тропонин

Тропониновый комплекс, составляющий 5% миофибриллярного белка, представляет собой связанный с тропомиозином гетеротример (рис. 16.12). Совместно с тропомиозином тропонин реагирует на изменения в содержании ионов кальция и регулирует актин-миозиновые взаимодействия и тем самым сокращение и релаксацию мышц [43].

Молекулярная масса тропонина-С (*TnC, кальцийсвязанной подъединицы тропонина*) — около 18 000 [45]. *Tn*C состоит из четырех сайтов связывания ионов кальция; два из них характеризуются высоким сродством с ионами кальция (K_d — около 10^{-9} М) и связывают также ионы магния. Эти два сайта связывания расположены в С-терминальной части молекулы. Два других сайта связывания кальция с более низким сродством (K_d — около10^{-6} М) находятся в N-терминальной части молекулы. Эти два сайта специфичны для связывания ионов кальция. Считается, что в мышце, находящейся в состоянии покоя, эти сайты с более низким сродством пусты из-за низкого содержания ионов кальция [Ca^{2+}] (< 10^{-7} М), тогда как сайты с высоким сродством заняты ионами магния из-за их высокой внутриклеточной концентрации по сравнению с ионами кальция [46]. Когда двигательный нейрон инициирует сокращение мышцы, концентрация ионов кальция [Ca^{2+}] возрастает до уровня, превышающего 10^{-5} М. Некоторые из этих ионов кальция связываются с сайтами связывания *Tn*C с низким сродством, переключая конформационное изменение этого белка, которое передается тропомиозину другими подъединицами тропонина.

Тропонин-Т связывает тропониновый комплекс с тропомиозином, а тропонин-I ингибирует активность актомиозиновой АТФазы. Место связывания тропонинового комплекса располагается вблизи соединения «голова-хвост» тропомиозинового филамента при соотношении «один тропонин на молекулу тропомиозина» [43].

16.3.4.5. Структурные белки

16.3.4.5.1. Титин

Титин (его также иногда называют коннектином) — это третий по распространенности белок мышечных миофибрилл. Со своими более чем 38 000 аминокислотными остатками и молекулярной массой в примерно 4 200 000 титин является крупнейшей единой полипептидной цепочкой. Несмотря на свою распростра-

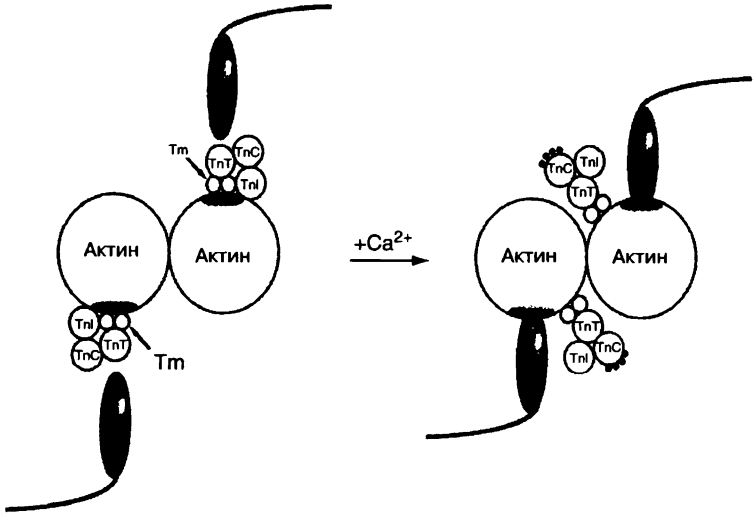


Рис. 16.12. Регулирование сокращения и релаксации мышц с помощью тропомиозин-тропонинового комплекса. Когда мышца находится в состоянии покоя, тропомиозин стерически блокирует головки миозина и не дает им связываться с сайтами связывания миозина (затененные области) актиновых филаментов. Когда кальций связывается с тропонином-С, этот тропопониновый комплекс подвергается конформационному изменению, заставляющему тропопонин глубже проникать в актиновую «канавку», обнажая сайты связывания миозина и вызывая образование миозин-актиновых мостиков. По [133]

ненность в мышечной ткани, титин был открыт относительно недавно (в 1979 г.) группой ученых во главе с Вангом К. [47]. Как это ни странно, титин ускользал от внимания исследователей именно из-за своих размеров: очень высокая молекулярная масса титина ограничивает его подвижность на обычных системах из полиакриламидного геля (ПААГ), типичных для исследования мышечных белков. Применение менее вязких ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (метод *DSN-PAGE*) обеспечивает намного более крупные поры в гелях, что позволяет титину мигрировать в эти гели и дало возможность обнаружить титин и еще один крупный белок — небулин.

Титин представляет собой гибкий, эластичный филаментный белок, размер молекулы которого составляет около 1 мкм, благодаря чему он захватывает половину саркомера (см. рис. 16.3, *а*). N-конец титина располагается в Z-диске, а С-конец закреплен на М-линии. Зона титина в I-полоске действует как своего рода «молекулярная пружина», обеспечивающая точное структурное упорядочение толстых и тонких филаментов и инициирующая пассивную мышечную жесткость. Протяженный участок титина в скелетной мышце состоит из тандемно организованных иммуноглобулинподобных областей, а *PEVK*-сегмент богат пролином (Р), глутаматом (Е), валином (V) и лизином (К) [48]. Помимо этих сегментов, протяженный участок титина в сердечной мышце содержит уникальную последовательность из 572 остатков аминокислот, являющуюся частью элемента N2B, специфичного для мышечной ткани сердца [49]. Эти сегменты характеризуются особо высокой прочностью на изгиб, и в результате удлинение «провисшего» саркомера приводит к увеличению длины тандемных Ig-сементов с последующим удлинением *PEVK*-сегмента. Когда мышца находится в состоянии покоя, титин обеспечивает длину мышцы, равную длине ее расслабленного саркомера. Кроме того, титин является своего рода шаблоном, по которому молекулы миозина образуют толстые филаменты, поскольку в синтезе мышечных белков в ходе эмбриогенеза титиновые гены экспрессируются одними из первых [50].

16.3.4.5.2. Небулин

Как и титин, небулин из-за своего необычно крупного размера (M_r — около 800 000) был открыт относительно недавно. Его содержание сравнимо с содержанием тропомиозина и тропонина. Небулин ассоциируется с тонкими филаментами скелетной мышцы — С-конец частично входит в Z-диски, а N-конец вытянут к соответствующим концам тонких филаментов. Аналогично титину, в последовательности небулина также присутствует суперповторяемость последовательности аминокислот, но в отличие от титина небулин не так растяжим, и его уникальные структурные свойства делают небулин главным кандидатом на роль «молекулярной линейки» для определения точной длины тонких филаментов [51]. Кроме того, неболин, возможно, участвует в сигнальной ретрансдукции, регулировании мышечной контрактации и создании силы для миофибрилл [52].

16.3.4.5.3. α-Актинин

Основным компонентом Z-диска является α-актинин (M_r — около 97 000), действующий в качестве актинсвязывающего белка. α-Актинин состит из трех основных областей: глобулярной N-концевой актинсвязывающей области, центральной палочкообразоной области и С-концевой области, которая несет сродство с кальций-связывающим белком кальмодулином [53]. Палочкоподобные области мономеров α-актинина взаимодействуют между собой, образуя антипараллельные димеры, способные к перекрестной сшивке актиновых и титиновых филаментов соседних саркомеров. Фактически α-актинин способен ассоциироваться в Z-диске с различными «белками-партнерами». Эти межбелковые взаимодействия обеспечивают целостность Z-диска при растяжении и могут служить дополнительными сайтами связывания для других белков, ассоциированных с Z-диском (см. рис. 16.5).

16.3.4.5.4. Кэпирующий белок *CapZ* и тропомодулин

Образование актиновых филаментов — процесс динамический, и регулирование этого процесса в ходе формирования миофиламентов является ключевым фактором обеспечения одинаковой длины филаментов. Белки, присоединяемые к тонким филаментам и кэпирующие их, блокируют удлинение и укорачивание филаментов. Белок *CapZ*, называемый также β-актинином, представляет собой кэпирующий белок, участвующий в нуклеации и стабилизации актиновых филаментов. Это гетеродимер, состоящий из α-

и β-подъединиц (молекулярной массой соответственно 36 000 и 32 000), причем для кэпирования необходимы обе подъединицы [37, 54]. В поперечно-полосатых мышцах белок *CapZ* локализован в Z-дисках, где он связывает α-актинин и, по всей вероятности, является «якорным» комплексом для тонких филаментов. Тропомодулин (молекулярная масса около 40 000) кэпирует соответствующие концы тонких филаментов, которые, в свою очередь, удлиняют эти тонкие филаменты [37].

16.3.4.5.5. Десмин

Десмин (M_r — около 55 000) является доминирующим белком промежуточных филаментов (диаметром 10 нм) и обеспечивает структурную целостность большинства клеток. В мышечной ткани десминовые филаменты обнаружены на периферии Z-дисков, и похоже, что эти филаменты служат для поперечной сшивки соседних миофибрилл и связывания миофибриллярных Z-дисков с сарколеммой [55] (см. рис. 16.5).

16.3.4.5.6. Филамин

В мышечной ткани обнаружены три вида филамина — α, β и γ. У них сходная структура молекулы: после N-концевой актинсвязывающей головки рсположены 24 иммуноглобулинподобные области. γ-Филамин (известный также как *ABP*-280) — это мышечно-специфичная изоформа филамина. Филамин локализован на периферии Z-диска и обеспечивает очень важную связь между сарколеммой и цитокаркасом саркомера. Поскольку γ-филамин существует уже на самых ранних стадиях развития Z-дисков, предполагают, что эта изоформа филамина может участвовать в образовании Z-дисков саркомера [56].

16.3.4.5.7. С-белок и Н-белок

С-белок (молекулярная масса — около 140 000) и Н-белок (молекулярная масса — около 58 000) являются миозинсвязывающими белками. Оба они распределены в С-зоне (средней трети каждой половины А-полоски) толстого филамента и образуют последовательность из перекрученных «лент», расположенных друг от друга на расстоянии 43 нм, хотя Н-белок обнаружен и вне этой зоны [57]. С-белок присутствует в молярном соотношении с тяжелыми миозиновыми цепями примерно 1 8 и взаимодействует и с миозиновыми, и с титиновыми филаментами. Эти белки могут как связывать, так и разделять толстые филаменты А-полоски [58].

16.3.4.5.8. Миомезин и другие белки М-линии

Основным белком М-линии является миомезин — полипептид молекулярной массой около 185 000 Да [37]. Помимо того, что он служит своего рода каркасом для связывания титина и миозина, он может участвовать в поддержании структурной целостности толстых филаментов. Еще одним компонентом М-линии является креатинкиназа, фермент, участвующий в регенерации АТФ мышечной ткани (см. раздел 16.3.4.2).

16.3.4.6. Белки саркомплазматического ретикулума и сарколеммы

В мембранах различных органелл мышечной ткани — ядер, митохондрий, сарколеммы и т. п. — содержатся белки, выполняющие определенные функции в соответствии со специфическими потребностями этих органелл и клеток. Белки саркоплазматического ретикулума (*SR*) заслуживают особого внимания благодаря их роли в хранении, транспорте и высвобождении ионов кальция в мышечной ткани. Так как эти ионы «включают» сокращение мышц и регулируют важнейшие стадии гликолиза, то они выполняют ключевые функции в мышечной активности живых организмов. Эти *SR*-белки определяют также качество мяса в том смысле, что от них зависит степень контроля концентрации ионов кальция в саркоплазме в начальный период посмертного окоченения (состояния *postmortem*). Несмотря на то что в сарколемме и сарколазматическом ретиклуме обнаружено много белков, здесь мы рассмотрим лишь три важнейших из них. Два белка, а именно рецептор рианодина (*RyR*) и рецептор дигидропиридина (*DHPR*), являются ключевыми элементами механизма высвобождения кальция, ответственного за инициирование мышечных сокращений. Третий белок — это кальциевый насос, который участвует в релаксации мышц.

Рецептор дигидропиридина представляет собой мембранный белковый комплекс, заключенный в Т-трубочки и служащий своего рода датчиком изменений электрического напряжения в клеточной мембране при инициации мышечных сокращений [59]. Он состоит из четырех разных подъединиц, обозначаемых α_1, β, γ и $\alpha_2\delta$. Подъединица α_1 образует кальциевый канал, ответственный за исполнение функции «вольтметра», в котором имеется сайт, на который воздействует ряд лекарственных средств (называемых дигидропиридинами), усиливающих функцию данного белка. Функции других подъединиц изучены хуже, но существуют определенные данные, свидетельствующие об их роли в усилении процесса возбуждения и сокращения [60]. Функции *DHPR*-белков в различных тканях зависят преимущественно от их экспрессированой изоформы. Например, специфичная для сердечной мышцы изоформа α_1 обусловливает диффузию ионов кальция в клетку из внеклеточного пространства. Эта же изоформа в скелетных мышцах в качестве кальциевого канала преимущественно неактивна.

Участок саркоплазматического ретикулума, называющийся «терминальной цистерной», располагается рядом с Т-канальцем. В нем высоко содержание белка, который называется «*SR*-кальциевым каналом» или *RyR*, поскольку он обладает высоким сродством к токсичному растительному алкалоиду (рианодин). Семейство *RyR*-белков состоит из последовательности гомологичных белков, зачастую именуемых *RyR*1, *RyR*2 и *RyR*3. В скелетных мышцах млекопитающих белок доминирует изоформа *RyR*1, тогда как изоформа *RyR*2 доминирует в сердечной мышце.

Белок *RyR*2 обнаружен также и в других тканях, в том числе в головном мозге. Белок *RyR*3 присутствует в различных немышечных тканях млекопитающих, и в следовых количествах — в скелетных мышцах. У птиц, рыб и земноводных он присутствует в большинстве склететных мышц в количествах, примерно равных содержанию *RyR*1 [61]. Белки семейства *RyR* выполняют функцию каналов или трансмембранных «трубопроводов» для диффузии ионов кальция из полости саркоплазматического ретикулума, где их концентрация составляет несколько миллимоль/л, в саркоплазму, где остаточная концентрация ионов кальция составляет менее 10^{-7} М.

Белок *RyR* имеет огромные размеры и состоит из четырех идентичных подъединиц, молекулярная масса каждой из которых составляет примерно 550 000, и в результате молекулярная масса этого функционального ионного канала равна примерно 2 200 кДа. С белком *RyR* тесно ассоциированы несколько других белков, усиливающих его действие [11]. Более 80% массы *RyR* сосредоточено с цитоплазматической стороны SR-мембраны, образуя структуру, которую иногда называют перемычкой, заполняющией зазор между терминальной цистерной *SR* и Т-канальцем. Имеются многочисленные свидетельства, что *DHPR*- и *RyR*-белки скелетных мышц физически ассоциированы [12]. Снимки под электронным микроскопом показывают, что DHPR-белки ассоциированы в группы из четырех единиц, своего рода тетрады. Перекрытия этих *DHPR*-тетрад в Т-канальце с белками-перемычками саркоплазматического ретикулума (*RyR*-белками) позволяют высказать предположение, что с тетрадой взаимодействует каждый второй *RyR*-белок, то есть другие *RyR*-белки не связаны с *DHPR* (рис. 16.13) [62]. Последние данные свидетельствуют, что у птиц, рыб и земноводных белок *RyR*3, обычно содержащийся в тех же количествах, что и *RyR*1, сосредоточен ближе к периферии перемычки между *SR* и Т-канальцем, то есть он не взаимодействует с ней или с *DHPR*-тетрадой [63].

Регулирование высбождения ионов кальция в саркоплазму приводит к сокращению мышцы, причем белки *DHPR* и *RyR* действуют согласовано с ассоциированными с ними регуляторными белками. При уменьшении нейромышечного сигнала на сокращение эти белки возвращаются в свое «состояние покоя», а концентрация кальция в саркоплазме восстанавливается под действием кальциевого насоса. Этот насос представляет собой белок, локализованный главным образом в продольно расположенном саркоплазматическом ретикулуме, то есть в том участке *SR*, который расположен дистально к терминальной цистерне. Используя АТФ как источник энергии, этот кальциевый насос транспортирует через *SR*-мембрану в полость *SR* два иона кальция на каждую гидролизованную молекулу АТФ в направлении, противоположном градиенту концентрации [64].

16.3.5. Механизм «возбуждение-сокращение»

Четкое понимание механизма мышечного сокращения на первый взгляд может казаться не имеющим отношения к качеству мяса. Различие между живой мышечной тканью и мясом является буквально разли-

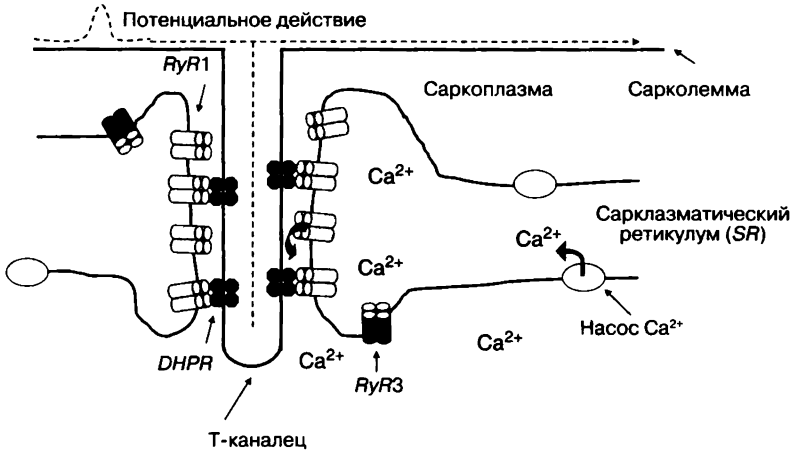


Рис. 16.13. Схематическое изображение механизмов потребления и высвобождения ионов кальция в скелетной мышце. Рецепторы дигидропиридина (*DHPR*) в мембране Т-канальца играют роль датчиков для действий, инициируемых двигательным нейроном. Рецепторы рианодина (*RyR*1 и *RyR*3), расположенные в саркоплазматическом ретиклуме (*SR*) выполняют функцию белков кальциевого канала, открывающегося для диффузии ионов кальция из *SR* в саркоплазму при мышечном сокращении. Белки кальциевого насоса снижают концентрацию ионов кальция в саркоплазме путем перемещения ионов кальция в *SR* после закрытия пор *RyR*. В скелетных мышцах млекопитающих каждый второй белок *RyR*1 соединен с *DHPR*-тетрадой. Белок *RyR*3 локализуется в периферийной области Т-канальца и не ассоциируется с *DHPR*. Содержание белка *RyR*3 в скелетных мышцах млекопитающих очень мало и примерно равно содержанию белка RyR1 в большинстве мышечных тканей птиц, рыб и земноводных

чием между «жизнью» и «смертью», но после убоя любого животного в мышечной ткани происходит последовательность переходных реакций (см. далее раздел 16.4), определяющих преобразование «мышцы» в «мясо». Биохимические механизмы этого преобразования — это практически те же механизмы мышечных сокращений, а также вспомогательные физиологические и биохимические реакции живой мышечной ткани, причем все они во многом определяют качество мяса.

Когда мышечная клетка находится в состоянии покоя, в сарколемме существует некоторый электрический потенциал — примерно 90 мВ, а концентарция ионов кальция в межклеточном пространстве очень низка (менее 10^{-7} М). Тропомиозин в миофибриллах локализован в актиновом филаменте так, что он стерически препятствует образованию мостиков между миозином и актином. После стимулирования мышечного волокна двигательным нейроном эта мышечная клетка в месте нейромышечного присоединения деполяризуется. Это изменение электрического потенциала перемещается по сарколемме и попадает внутрь мышцы через Т-каналец. Белок *DHPR* реагирует на этот электрохимический градиент в мембране путем конформационного изменения, передающегося через соединение Т-канальца с саркоплазматическим ретикулумом белкам *RyR*, локализованным в терминальной цистерне *SR*. Эти белки *RyR*, в свою очередь, реагируют путем открытия своей канальной поры. Ионы кальция «перетекают» из полости саркоплазматического ретикулума, где их концентрация составляет более 10^{-3} М, в саркоплазму, благодаря чему концентарция ионов кальция в ней повышается более чем в 100 раз и становится выше 10^{-5} М. Ион Ca^{2+} присоединяется к *Tn*C, что приводит к конформационному изменению тропонинового комплекса, которое передается тропомиозину, и положение последнего в актиновом филаменте меняется. Тропопомиозин глубже погружается в канавку тонкого филамента, «обнажая» сайты связывания миозина на мономерах актина и позволяя тем самым формироваться мостикам между актином и миозином (см. рис. 16.12) [24].

На этой стадии цикла мышечного сокращения (рис. 16.14) в нуклеотидсвязывающем сайте головка миозина содержит АДФ и неорганический фосфат (P_i), являющиеся продуктами гидролиза АТФ. «Обнажение» сайтов связывания миозина на актиновом филаменте обусловливает слабое связывание головки миозина с тонким филаментом, причем головки миозина располагаются примерно перпендикулярно к оси толстого филамента. После связывания актина головка миозина высвобождает P_i, что приводит к небольшому конформационному изменению миозина и усилению связи миозина с актином. Затем в головке миозина сразу же происходит значительное конформационное изменение, которое называют «ударом тока», в результате чего головки миозина продвигают актиновый филамент вдоль толстого филамента к М-линии словно гребками. После этого из миозиновой головки высвобождается АДФ, а АТФ связывается со свободным нуклеотидсвязывающим сайтом, что включает высвобождение головки миозина из актина. Гидролиз АТФ в головке миозина приводит к конформационному изменению, в результате

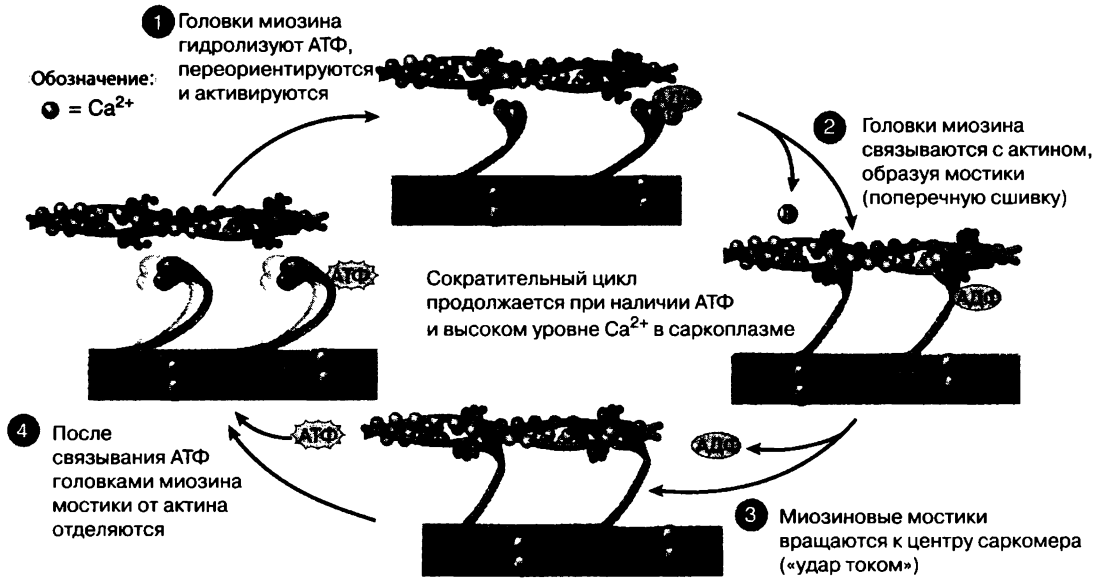


Рис. 16.14. Циклическое образование мостиков в ходе мышечного сокращения. По [131]

которого головка миозина «выпрямляется» так, что снова становится почти перпендикулярной толстому филаменту, и реакционная последовательность начинает следующий цикл мышечного сокращения [65]. Поскольку актиновый и миозиновый филаменты саркомера сориентированы к М-линии, каждый цикл мышечного сокращения приводит к уменьшению расстояния между Z-дисками, тем самым влияя на сокращение мышечной ткани (см. рис. 16.4 и 16.14) [66].

В целях поддержания напряжения и сокращения мышцы циклическое формирование миозиновых мостиков, «удары током» и отделение происходят до тех пор, пока продолжается нейронная стимуляция мышечного волокна. По мере уменьшения стимула содержание ионов кальция в саркоплазме уменьшается под действием белкового насоса кальция до концентрации, соответствующей состоянию покоя. Как только снижается концентрация ионов кальция в саркоплазме, запасы Ca^{2+} в *Tn*C, поступающие из Ca^{2+}-связывающих сайтов с низким сродством, истощаются, что приводит к конформационному изменению *Tn*C, соответствующему состоянию покоя мышечной ткани. Это конформационное изменение вынуждает тропомиозин переместиться обратно с положения состояния покоя на актиновом филаменте, блокируя тем самым формирование мостиков между миозином и актином и вызывая в результате мышечную релаксацию.

Очень важно понимать множественные функции АТФ в сокращении мышц и учитывать его важную роль в преобразовании мышечной ткани в мясо. В качестве доминирующего источника энергии для клетки гидролиз фосфодиэфирной АТФ-связи преобразуется миозином в механическую энергию, обусловливающую мышечное сокращение. Помимо бесчисленного количества других химических реакций с участием АТФ, он выполняет главную роль в работе кальциевого насоса, необходимой при преобразовании «мышцы» в «мясо». По мере снижения уровня АТФ способность кальциевого насоса к комплексообразованию (секвестированию) иона Ca^{2+} саркоплазмы уменьшается. И наконец, вполне очевидно, что после смерти животного уровень АТФ резко падает до точки, когда его уже недостаточно для связывания головок миозина, и миозин отъединяется от актина. Положение в конце «удара током», в котором головка миозина связана с актином, иногда называют «ригор комплекс» (*rigor complex*).

16.3.6. Типы мышечной ткани

Скелетная мышца состоит из нескольких типов мышечных волокон, работающих по-разному, в том числе регулирующих скорость сокращения («быстро-медленно») и поддерживающих механизмы метаболизма (аэробный, он же окислительный, или анаэробный, он же гликолитический). Эти типы мышечных воло-

кон обладают высоким адаптивным потенциалом, и на их фенотипические профили влияют тип нейрона, возбуждающего данное мышечное волокно, нейромышечная активность, подготовленность в результате физических упражнений или тренировок, приложение или снятие механической нагрузки, гормоны и возраст [67]. Типы мышечной ткани определяют по гисто- и биохимическим, морфологическим или физиологическим показателям, но классификация мышечных волокон с использованием разных методов совпадает далеко не всегда. Первоначально мышечные ткани разделяли на быстро сокращающиеся (тип I) и медленно сокращающиеся (тип II) в зависимости от скорости укорочения отдельных волокон [68]. Такая классификация согласуется с морфологическими различиями, так как быстро сокращающиеся мышечные ткани у некоторых видов животных кажутся белыми, а медленно сокращающиеся — красными. Интенсивая красная окраска обусловлена высоким содержанием миоглобина, являющегося готовым источником кислорода для окислительного метаболизма. В медленно сокращающихся красных мышечных волокнах обычно больше митохондрий и жиров, служащих своего рода «топливом» для окислительно метаболизма, тогда как быстро сокращающиеся мышечные ткани более приспособлены для анаэробного метаболизма, «топливом» для которого служат углеводы. Позднее мышечные волокна типов I и II были переклассифицированы по бифункциональной номенклатуре, основанной на сократительных свойствах и окислительной способности волокон. Говоря более конкретно, «быстро сокращающиеся окислительные» (*fast-twitch oxidative, FOG*) мышцы сокращаются с большей скоростью контрактации, чем «медленно сокращающиеся окислительные (*slow-twitch oxidative, SO*), но обладают более высокой окислительной способностью, чем «быстро сокращающиеся гликолитические» (*fast-twitch glycolytic, FG*) мышцы.

С появлением иммуногистохимических методов окрашивания, способных различать изоформы тяжелых цепей миозина, стало возможным далее подразделить мышечные волокна на подтип I («медленно краснеющие») и подтип IIa («быстро краснеющие»), тогда как подтип IIb («быстро белеющие») подразделяется у грызунов на типы IIx и IIb, а у человека — на тип IIx (но не на тип IIb) [69]. Между волокнами типов I и *SO* существует хорошая корреляция, однако между волокнами типов IIa и *FOG,* а также между типами IIb и *FG* корреляции варьируют сильнее. Волокна типа IIb не всегда зависят от анаэробного или гликолитического метаболизма, а волокна типа IIa также не всегда зависят от метаболизма по аэробному или окислительному механизму [70]. С появлением новых молекулярных методов становится очевидным, что в будущем появятся более специфичные класификации мышечных тканей.

16.4. Превращение «мышечной ткани» в «мясо»

В живой мышечной ткани очень развита система метаболизма, предназначенная для поддержания специфической функции мышц, а именно для превращения химической энергии в механическую. Непосредственным источником химической энергии является АТФ, и поддержание реакций метаболизма направлено большей частью на обеспечение достаточного уровня АТФ, необходимого для сокращения мышц и поддержания клеточного гомеостаза. Для обеспечения работы всех этих метаболических механизмов очень важна система кровоснабжения мышечной ткани, обеспечивающая ее кислородом и другими энергетическими субстратами, а также удаляющая из нее диоксид углерода и другие продукты метаболизма.

После убоя животного первой стадией превращения мышечной ткани в мясо является снижение поступления крови в мышечную ткань. Хотя физиологическая смерть животного наступает спустя мгновения после убоя, различные органы, включая мышцы, включают резервные механизмы в тщетных попытках поддержать клеточный гомеостаз. Без непрерывной подачи кислорода в мышечную ткань она для поддержания аэробного метаболизма утилизирует остаточный кислород, связанный с миоглобином. Сразу же после этого доминирующим путем метаболизма для регенегерации АТФ становится анаэробный гликолиз. По мере накопления конечных метаболитов и исчерпания запасов субстратов синтез АТФ не может восполнить потери из-за высокой скорости его гидролиза. Вследствие остановки кальциевого насоса концентрация ионов кальция в саркоплазме уже не может поддерживаться на уровне, соответствующем состоянию покоя. Также останавливаются и другие ионные насосы, требующие АТФ, в частности, Na^+–K^+–АТФазы. Снижение концентрации АТФ приводит к увеличению жесткости мышечной ткани, известному как состояние посмертного окоченения (*rigor mortis*), обусловленному недостатком АТФ для разъединения миозина и актина в ходе сокращения. Как правило, эндогенная ферментативная активность

приводит к частичной деградации структуры мышечных филаментов. Длительность этой последовательности реакций во многом зависит от вида животного и, как будет показано далее, даже от внутривидовых различий.

Существует несколько главных источников энергии для удовлетворения потребностей мышечных тканей в начале состояния посмертного окоченения. Быстро доступным резервуаром высокоэнергетического фосфата является креатинфосфат (*CrP*); по мере гидролиза АТФ для удовлетворения потребностей мышечного сокращения, креатинкиназа переносит часть фосфата из *CrP* в АДФ, тем самым регенрируя АТФ. На этой стадии в генерировании АТФ также участвует фермент аденилаткиназа (см. раздел 16.3.4.2), однако в мышечной ткани в состоянии *post mortem* эти источники АТФ быстро истощаются. Следующим наиболее доступным источником для синтеза АТФ обычно является гликоген. Фермент фосфорилаза расщепляет гликоген на мономеры глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата, участвующего в генерации АТФ по гликолитическому (анаэробному) пути. Конечный продукт анаэробного метаболизма гликогена пируват в отсутствие кислорода преобразуется в накапливающуюся в мышечных тканях молочную кислоту.

Как видно из рис. 16.15, скорость начального образования АТФ из *CrP* и гликогена примерно равна скорости утилизации АТФ, благодаря чему поддерживается его концентрация около 5 мМ. До тех пор, пока уровень АТФ остается высоким, физиологические потребности клеток мышечной ткани обычно удовлетворяются, а ее физические свойства на этой ранней стадии превращения в мясо («фаза задержки») остаются сходными с живой тканью. Внешне мышечная ткань остается мягкой и при растяжении удлиняется. Тем не менее даже при высоком уровне АТФ его гидролиз для поддержания физиологических потребностей приводит к образованию и накапливанию ионов водорода, снижающих значение pH мышечной ткани. Скорость снижения pH во многом зависит также от темпов накопления молочной кислоты, что служит своего рода индикатором посмертного гликолиза [9]. Как мы увидим далее, чрезмерные изменения скорости посмертного гликолиза зачастую бывают связаны с проблемами качества мяса. Продолжительность «фазы задержки» бывает самой разной в зависимости от вида животного, его генетических особенностей, предсмертного пищевого статуса, ухода за животными перед убоем и, возможно, от способа убоя. Что касается так называемого «красного» мяса, эта фаза может длиться до 12 ч, а у мяса птицы она занимает от 30 мин до 2 ч [2].

Когда запасы *CrP* близятся к истощению, концентрация АТФ начинает снижаться, так как его утилизация превышает способности к регенерации, и начинается состояние ригора (см. рис. 16.15). По мере снижения уровня АТФ это состояние посмертного окоченения усиливается и выражается в увеличении сопротивляемости мышечной ткани растяжению. Истощение запасов АТФ снижает способность белков кальциевого насоса поддерживать концентрации ионов кальция в саркоплазме на субмикромолярном уровне или в диапазоне концентраций, характерных для состояния покоя мышцы. Аналогичным образом постепенно увеличивается количество мостиков между актином и миозином, и актин остается заблокированным из-за нехватки АТФ для разъединения этих двух белков, что быстро приводит к максимальной жесткости и исчезновению растяжимости мышечной ткани. Как и следовало ожидать, на этой стадии наблюдается некоторое уменьшение длины саркомера, размер которого во многом определяет жесткость мяса.

Заключительная стадия превращения мышечной ткани в мясо называется разрешением (расслаблением) окоченения или созреванием. Она может длиться от нескольких суток в случае мяса птицы, свинины и баранины до двух недель в случае говядины. Во время этой стадии созревания намного увеличивается растяжимость мышечной ткани и ее мягкость.

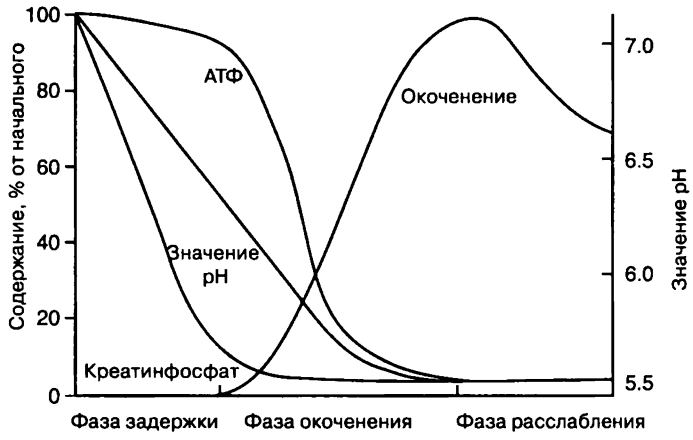


Рис. 6.15. Графическое представление посмертных изменений концентрации АТФ, креатинфосфата, значения pH и развития окоченения в зависимости от времени. По [133]

Основой для этих позитивных изменений является преимущественно протеолитическое разрушение ультраструктуры мышечных волокон, особенно заметное в районе Z-дисков, что приводит к быстрому нарушению структурной целостности. Несмотря на то что для последующего расслабления окоченения во многом важно повышение жесткости в состоянии посмертного окоченения, считается, что разрушение мышечной структуры и увеличение мягкости мяса обусловлено преимущественно протеолизом [71].

16.4.1. Посмертное разрушение мышечных белков

Обшепризнано, что по мере превращения мышечной ткани в мясо последнее становится более мягким в зависимости от продолжительности хранения в состоянии *post mortem*. Подобная тендеризация может, по крайней мере частично, объясняться разрушением миофибриллярных и цитоскелетных белков мышечной ткани [72].

Что касается мышечных протеаз, то применительно к роли в посмертном разрушении мышечного белка наиболее широко изучался кальпаин. Кальпаин — это активируемая кальцием цистеиновая протеаза, наиболее активная при нейтральных значениях pH. Активность кальпаина регулируется различными факторами, в том числе кальцием, фосфолипидами и кальпастатином, широко распространенным ингибитором кальпаинспецифичного белка [73]. В мышечной ткани главным образом экспрессируются три различных кальпаина: два повсеместно распространенных кальпаина и кальпаин 3 [74]. К повсеместно распространенным кальпаинам относятся μ-кальпаин, для полуактивации которого требуются от 5 до 50 мкМ кальция, и *m*-кальпаин, для полуактивации которого требуется 0,25–1 мМ кальция Ca2+. Эти две изоформы широко распространены в тканях, и считается, что они участвуют в важнейших клеточных функциях, опосредованных сигнальным путем на основе ионов кальция. Кальпаин 3 (его также обозначают p94 или CAPN3) представляет собой специфичную для скелетных мышц изоформу, и для его активации требуется меньше ионов кальция. Обычные кальпаины состоят из двух подъединиц: каталитической (молекулярной массой около 80 000) и регуляторной (молекулярной массой около 30 000). Регуляторные подъединицы у двух изоформ гомологичны, а каталитические несколько различаются. У кальпаина 3 характерная классическая структура, за исключением того, что у него три уникальные последовательности, не обнаруженные у других кальпаинов. Обычные кальпаины, как правило, локализуются в Z-дисках, и обработка миофибрилл кальпаинами вызывает быструю и полную утрату Z-дисков. В клетках скелетных мышц кальпаин 3 специфично связан с определенными участками титина [75], но не «обрезает» его. По мере того, как в состянии *post mortem* возрастает концентрация ионов кальция, кальпаины (главным образом обычные) активируются и инициируют разрушение мышечных белков (тропонина-Т, титина, небулина, С-протеина, десмина, филамина, винкулина и синемина) [72]. Большая часть этих белков (например, титин и небулин) или непосредственно прикреплена к миофибриллярным Z-дискам, или тесно с ними ассоциирована (например, филамин, десмин и синемин), или расположена вблизи (винкулин) от Z-дисков. При почти полном разрушении Z-дисков актин и миозин пассивно высвобождаются из саркомера вместе с другими белками и становятся субстратами для прочих протеолитических ферментов.

Катепсины представляют собой лизосомные протеазы и максимально активны в кислом диапазоне значений pH, то есть в условиях, преобладающих в оставшемся периоде *post mortem*, особенно в периоде созревания. Это предполагает, что для достижения требуемой степени тендеризации при созревании активность катепсинов более важна, чем деятельность кальпаинов. Вместе с тем, когда протеиназы удерживаются в миофибриллах, именно активность кальпаинов определяет ход протеолиза при тендеризации *post mortem*. Более того, тендеризация *post mortem* опосредована наличием ионов кальция [76], то есть показателем, характерным в скелетных мышцах только для кальпаиновой протеолитической системы. И все же важностью катепсинов при созревании мяса не следует пренебрегать. Их межклеточная локализация и способность воздействовать в состоянии *post mortem* на самые разные белки скелетных мышц делает их логичными кандидатами на участие в посмертных протеолизе и тендеризации [77].

Протеасома — это крупная, довольно распространенная АТФ- и убиквитинзависимая протеолитическая система, которая в ходе созревания мяса также может быть вовлечена в разрушение миофибриллярных белков. Эта протеасома способна расщеплять *in vitro* актин и миозин [78], но не способна разрушать неповрежденные миофибриллы. Такие мышечные белки, как актин и миозин, высвобождаются из саркомера по Ca^{2+}/кальпаин-зависимому механизму еще до их убиквитинизации и разложения протеасомой.

У животных с избыточной экспрессией кальпастатина посмертное разложение под действием протеасомы понижено, что подтверждает участие в этом процессе кальпаинов [79]. Следовательно, кальпаин может быть инициатором разрушения миофибрилл, а протеасома отвечает за протеолитические реакции, в ходе которых все фрагменты миофибрилл разделяются и гидролизуются до аминокислот.

16.5. Влияние на качество мяса посмертных биохимических изменений

Решение о покупке мяса потребителем во многом определяется свойствами продукта, в частности, влагоудерживающей способностью (ВУС), цветом, содержанием жира и мягкостью (степенью тендеризации) мяса. Выложенные на витрине куски мяса неестественно светлого или темного цвета, а также чрезмерная потеря ими влаги в упаковке способны оттолкнуть покупателя, поскольку снижают потребительскую ценность продукта. Аналогичным образом негативный опыт потребителя при покупке им слишком жесткого мяса будет препятствовать последущим покупкам.

Качественные показатели мяса зависят от действия многих взаимодействующих факторов — вида и породы животного, его генотипа, рациона кормления, ухода за животными перед убоем, а также от охлаждения мяса после убоя, способов его переработки и режимов хранения. Далее мы рассмотрим ряд специфических примеров проблем с качеством и лежащие в их основе химические предпосылки.

После созревания мяса его характеристики во многом зависят от свойств живой мышечной ткани. Посмертный метаболизм мышечных тканей в красном мясе и мясе птицы приводит к снижению значений pH от физиологических (около 7,4) до примерно 5,5–5,9. Кроме того, перед формированием состояния «*rigor complex*» наблюдается определенное сокращение мышечной ткани.

Последствия такого снижения значений pH применительно к качеству мяса бывают и положительными, и отрицательными. Естественно, что кислый диапазон pH мяса задерживает рост микроорганизмов и тем самым увеличивает срок годности продукта по сравнению с нейтральными значениями pH живой мышечной ткани. Вместе с тем эти преимущества сводятся на нет экономическими потерями переработчиков из-за потери тканями влаги по мере снижения значений pH в кислую сторону. Изоэлектрическая точка миозина (доминирующего белка мышечной ткани) составляет примерно 5,0, и при этом значении pH суммарный электрический заряд равен нулю, межбелковые взаимодействия максимальны, а взаимодействия «белок–вода» минимальны. В результате миофибриллы сжимаются и теряют большую часть своей ВУС. Такая потеря влаги при хранении свежих и приготовленных мясных продуктов (иногда ее называют «потерей мясного сока») может оказаться весьма высокой и привести к снижению стоимости продукта, поскольку вид плавающего в жидкости куска мяса очень непригляден. Более того, поскольку мясо реализуется «на вес», потеря влаги снижает массу продукта и тем самым доход. Мясной продукт, потерявший много влаги, воспринимается покупателем как менее сочный и более жесткий. Следует также учитывать, что с мясным соком из мяса удаляются существенные количества витаминов, минеральных веществ, аминокислот и прочих нутриентов, которые для потребителя будут потеряны. Помимо снижения ВУС, из-за ускоренного гликолиза и снижения значения pH возникают и другие видимые дефекты.

16.5.1. Бледное, мягкое и водянистое мясо (*PSE*)

Снижению значения pH в результате гидролиза АТФ подвергаются все мышечные ткани при их превращении в «мясо», однако иногда скорость снижения pH бывает необычно высокой, и основное снижение происходит при достаточно высокой температуре туши. Например, в течение 45 мин после убоя при температуре около 37 °C значение pH мышечных тканей свиней обычно составляет 6,5–6,7. Тем не менее, за это же время pH некоторых туш может снизиться до значений менее 6,0. Именно такое сочетание ускоренного снижения pH при достаточно высокой температуре туши приводит к денатурации некоторых сократительных белков с последующей утратой ВУС, что приводит к явлению, называемому «мясо *PSE*» (*Pale, Soft, Exudative*, то есть «бледное, мягкое, водянистое») [80]. Помимо того что этот дефект свежего мяса зачастую отталкивает покупателей, пониженная функциональность белков в продуктах из такого мяса приводит к серьезным экономическим потерям мясоперерабатывающих предприятий.

Химические причины возникновения проблем с мясом *PSE* стали предметом многочисленных исследований, проводившихся более 50 лет. Очевидно, что предубойные, стрессовые для животных факторы, в частности высокие температуры, транспортировка, физические нагрузки, присутствие рядом с незнакомыми животными, способы обращения со скотом — все это во многом влияет на качество мясо. Точные механизмы влияния упомянутых стрессовых факторов на образование дефекта *PSE* до сих пор полностью не ясны, но из результатов многих исследований становится понятно, что сокращение действия стрессовых факторов позволяет существенно повысить общее качество мяса.

Повышает предрасположенность к негативному воздействию стрессовых факторов также генотип животного. В 1960-е гг. было замечено, что особенно подвержены воздействию стрессовых факторов некоторые группы свиней, и для описания этих наследственных мышечных расстройств свиней, выражающихся в низкой устойчивости к стрессу, был даже введен специальный термин «*PSS*» (*Porcine Stress Syndrome*, свиной стрессовый синдром) [81]. Свиньи обычно реагируют на стрессовые факторы путем формирования состояния, известного как «злокачественная гипертермия», характеризующегося сильным сокращением мышц, затруднениями дыхания и быстрого повышения температуры тела вплоть до возможного летального исхода. Мясо животных с таким расстройством, менее стойких к действию стрессовых факторов, чаще имеет дефект *PSE*, чем мясо обычных животных.

В последующие 30 лет была выявлена мутация рецептора рианодина *RyR*, отвечающего за синдром *PSS*. Замена тимина на цитозин при нуклеотиде 1843 в кодирующей последовательности *RyR* приводит к замене цистеина на аргинин в остатке 615 [82]. Эта мутация обусловливает чрезмерное высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума животного в состоянии стресса, что, в свою очередь, вызывает сильную контрактуру мышц и злокачественную гипертермию живых свиней. Чрезмерное высвобождение ионов кальция *post mortem* в мышечной ткани свиней с синдромом *PSS* обусловливает сокращение мышц и связанный с ним анаэробный гликолиз с последующим накоплением ионов водорода и выделением теплоты, что характерно для свинины с *PSE*-дефектом.

Дефект *PSE*-мяса обычно обнаруживается в свинине, однако в начале 1990-х гг. этот дефект стали все чаще выявлять и в мясе индейки. Сильное сходство этих дефектов у свинины и мяса индейки позволили высказать предположение, что возникновение этой проблемы в индюшатине также обусловлено мутацией *RyR* [83]. Как мы уже отмечали в разделе 16.3.4.6, в механизмах мышечных «возбуждений–контрактаций» у птиц и млекопитающих наблюдаются существенные различия. Таким образом, возможно, что в случае существования такой мутации она может происходить в изоформах и *RyR*1, и *RyR*3, или в обеих изоформах одновременно. До настоящего времени ни в каких изоформах *RyR* мышечной ткани индеек мутаций не обнаружено. Вместе с тем существуют определенные данные, что в скелетных мышцах индейки могут экспрессироваться другие транскриптивные варианты *RyR*, способные давать мясо *PSE* [84].

Еще одной генетической особенностью, способной приводить к дефекту *PSE* у свинины, является ген *Napole* (*RN*). В этом случае мутация представляет собой замену глутамина на аргинин в остатке 200 γ-подъединицы AMP-активированной протеинкиназы [85]. Это фермент в мышечной ткани выполняет различные функции, в том числе активирование путей образования АТФ, ингибирование путей с поглощением АТФ и инактивация гликогенсинтазы.

У свиней с доминирующей аллелью *RN*– обычно намного выше содержание гликогена, чем у животных с рецессивной аллелью *rn*+. Скорость снижения значения pH *post mortem* в мышечной ткани свиней с геном *Napole* обычно в пределах нормы, однако высокое содержание гликогена может ускорять снижение pH, и, следовательно, давать очень низкое конечное его значение, что в результате приводит к получению *PSE*-мяса с низкой функциональностью белков. Фактически, несмотря на пониженную ВУС по сравнению с обычной свининой, функциональность белков в переработанной свинине с аллелью *RN*– даже ниже, чем у свинины с мутацией *RyR*. Тот факт, что 65–80% свинины потребляется в переработанном виде, еще больше подчеркивает важность удаления у свиней гена *Napole*.

16.5.2. Темное, жесткое и сухое мясо (*DFD*)

Возможным следствием стресса, физических нагрузок или голодания животных перед убоем является истощение запасов гликогена, что вызывает другой дефект мяса, называемый *DFD* (*Dark, Firm and Dry* — темное, жесткое и сухое мясо) [86]. Цвет такого мяса может варьировать от темно-красного до очень темного,

почти черного — в отличие от алого цвета, типичного для парного мяса. Этот дефект особенно характерен для говядины, но имеются сведения о его появлении и у свинины. Отсутствие необходимых запасов гликогена приводит к более раннему завершению гликолиза, в результате чего окончательное значение pH остается относительно высоким (более 6,0). Похоже, что дефект *DFD* носит сезонный характер и чаще встречается в мясе животных, подвергавшихся продолжительному воздействию холодной дождливой погоды.

У мяса *DFD* намного выше ВУС, чем у нормального мяса, поскольку значение pH удалено от изоэлектрической точки миозина (около 5,0), но это преимущество сводится на нет ускоренным ростом микроорганизмов и слишком темным цветом, из-за чего от него отказываются покупатели.

Необычно темный цвет подобного мяса обусловлен высоким значением pH после убоя, из-за чего заряд мышечных белков остается высоким, минимизируя тем самым разделение мышечных миофибрилл и уменьшая рассеяние света. Кроме того, более активная респираторная активность митохондрий при высоких значениях pH уменьшает разложение оксимиоглобина в этих тканях.

16.5.3. Холодовое сокращение

В начале 1960-х гг. новозеландские переработчики баранины стали получать от европейских и американских импортеров рекламации на жесткость мяса. Это было довольно странным, поскольку новозеландские потребители никогда не жаловались на жесткость баранины. Было высказано предположение, что жесткость баранины была обусловлена условиями переработки и/или хранения [87].

Из проведенных в Новозеландском научно-исследовательстком институте мясной промышленности исследований стало понятно, что существует комплексная взаимосвязь между жесткостью мяса и условиями охлаждения до наступления окоченения (рис. 16.16). Если до наступления окоченения отделить мышцы от костей, то они сокращаются. Степень этого сокращения (окоченения) зависит от типа мышечной ткани (красной или белой), времени после убоя, физиологического состояния мышечной ткани и температуры. При температурах, близких к физиологическим, степень контрактации довольна высока, а при более низких температурах степень сокращения мышц снижается вплоть до достижения в температурном диапазоне 10–20 °C самой низкой точки. При указанных температурах сокращение мышечной ткани минимально. Если те же мышечные ткани подвергнуть воздействию еще более низких температур, то при температурах ниже 10 °C происходят резкое увеличение степени окоченения. Такое индуцированное холодом мышечное сокращение и называется «холодовым сокращением».

Взаимосвязь между холодовым сокращением и жескостью мяса была затем доказана и в работе [88] (рис. 16.17). Сила, необходимая для разрезания мышечной ткани заданного размера, определяется при помощи теста Уорнера–Братцлера (*Warner-Bratzler shear test*). Используя этот метод, авторы работы [88] показали, что по мере увеличения степени холодового сокращения жесткость мяса (измеряемая по силе сдвига) возрастает вплоть до точки, соответствующей сокращению мышечной ткани примерно на 40%. В этой точке наблюдается максимальное перекрытие тонких и толстых филаментов, и почти все головки миозина связаны с актиновыми филаментами. За этой точкой может происходить дополнительное сокращение, обусловливающее снижение жесткости. Объяснением этому служит то, что при определенных обстоятельствах (в частности, в отсутствие мышечного напряжения) мышечное окоченение

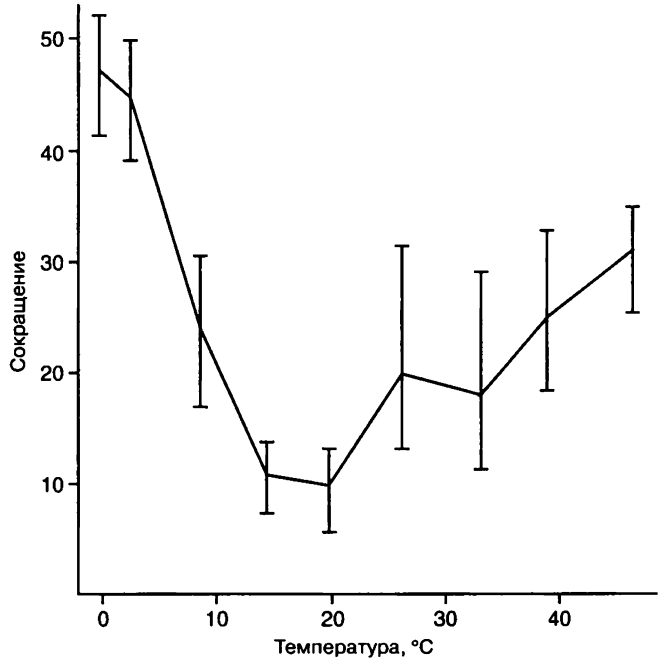


Рис. 16.16. Сокращение мышечной ткани говядины до наступления ригора как функция температуры хранения. По [136]

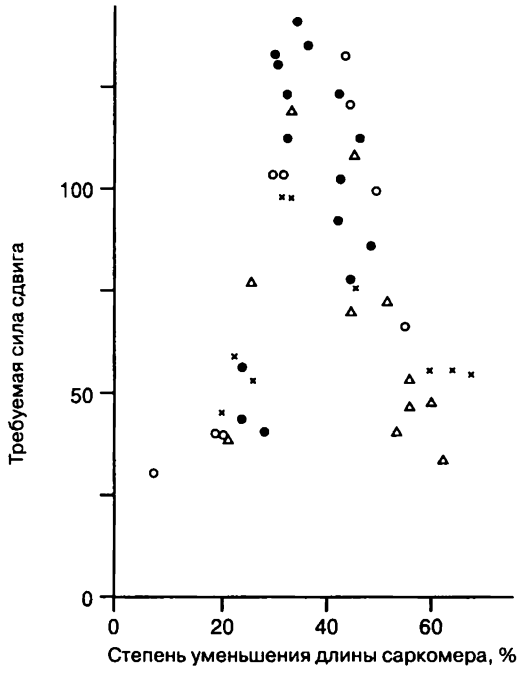


Рис. 16.17. Жесткость мяса, измеренная по силе сдвига, необходимой для разрезания образца мяса, как функция уменьшения длины саркомера. Степень мышечного сокращения зависит от температуры хранения и степени окоченения при размораживании. По [88]

может продолжаться до точки, когда толстый филамент разрывает Z-диск со значительным повреждением мышечной ультраструктуры, что вызывает увеличение мягкости [89]. С учетом этих наблюдений было усовершенствовано послеубойное охлаждение бараньих туш в целях снижения степени холодового окоченения. Последующие исследования в США и европейских странах подтвердили важность холодового сокращения для мясной индустрии и позволили свести эту проблему до минимума.

Механизмы, обусловливающие холодовое окоченение, до конца не ясны, но ключевую роль играют следующие факторы. Для проявления ходового окоченения мышечная ткань должна находиться в предригоровом состоянии — только в это время существует необходимый уровень АТФ для обеспечения мышечного сокращения энергией и для отсоединения головок миозина от актина, что необходимо для последующего цикла сокращения. Температура должна быть ниже 10 °С, и чем ближе к 0 °С, тем больше степень сокращения. И наконец, наиболее подвержены холодовому сокращению те мышечные ткани, в который больше процент красных мышечных волокон (например, говядина, баранина и ягнятина). У свинины холодовое сокращение встречается реже, поскольку в большинстве мышечных тканей свиней высок процент белых мышечных волокон. Относительно редко холодовое сокращение встречается и у мяса птицы.

Существуют многочисленные данные, что за явление холодового сокращения отвечают изменения в системе регулирования содержания ионов кальция в состоянии *post mortem* и температурно обусловленные изменения ферментативной активности. Как только температура мышечной ткани становится ниже 10 °С, бескислородные митохондрии и саркоплазматический ретикулум утрачивают свою способность к удерживанию ионов кальция. Белок кальциевого насоса в обычных условиях поддерживает концентрации ионов кальция в саркоплазме на уровне, соответствующем состоянию покоя мышцы, но при более низких температурах скорость реаккумуляции ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуме снижается, и концентрация ионов кальция повышается, включая мышечный сократительный механизм. Более всего подвержены холодовому сокращению красные мышечные волокна, поскольку их потребность в энергии обеспечивается окислительным путем метаболизма, и у них больше митохондрий, чем у белых мышечных волокон. Кроме того, в красных мышечных волокнах менее развита сеть саркоплазматических ретикулумов, что снижает способность этих волокон к реаккумуляции ионов кальция [86].

Способы предупреждения холодового сокращения изначально базировались на взаимосвязи скорости охлаждения туш и развития жесткости мяса. Для предупреждения холодового сокращения до наступления состояния *rigor mortis* были рекомендованы температуры порядка 10–20 °С, однако подобный подход вступал в противоречие с желанием максимально быстро понизить темературу туш в целях минимизации роста микроорганизмов на поверхности мяса. В 1970-х гг. в ходе экспериментов по электростимуляции туш было показано, что время, необходимое для наступления состояния *rigor mortis*, можно резко сократить [90]. Этот способ, ставший сегодня стандартным при переработке говядины и баранины на бойнях, мы рассмотрим в разделе 16.5.5.

16.5.4. Окоченение при размораживании мяса

Тесно связано с холодовым сокращением явление, проявляющееся в сильном сокращении мышечных волокон при размораживании мяса, предварительно замороженного до наступления посмертного окочене-

ния. Это явление впервые было описано в работе [91], авторы которой заметили, что при размораживании замороженного китового мяса происходит укорочение мышечных волокон вплоть до 60%, сопровождающееся существенным снижением ВУС. Окоченение при размораживании может быть обусловлено структурными изменениями в мембранах сарколеммы и саркоплазматического ретикулума из-за образования в них кристаллов льда. Нарушение целостности мембран приводит к попаданию ионов кальция в саркоплазму и включению механизма мышечного сокращения, так как уровни АТФ по-прежнему достаточно высоки. Кроме того, нарушение целостности мембран при размораживании приводит к избыточным потерям волокнами мясного сока. Для предупреждения такого окоченения при размораживании используют те же подходы — электростимуляцию или выдерживание туш до наступления посмертного окоченения при температурах выше температур замораживания.

16.5.5. Электростимуляция

Электростимуляция — это воздействие на туши животных после убоя электрическим током. Применяя электростимуляцию в самом начале посмертного окоченения, можно вызывать существенное сокращение мышечной ткани с последующей релаксацией, что ускоряет метаболизм мышечной ткани, оборот АТФ и развитие ригора. В зависимости от напряжения тока, частоты и продолжительности импульсов с помощью электростимуляции можно сделать мясо существенно более мягким, улучшить его вкус и запах, качество, срок хранения и реализации в розничной торговле, а также технологические свойства [92]. Именно благодаря улучшению цвета и качества мяса было обусловлено внедрение электростимуляции в мясоперерабатывающей промышленности США. В других странах основной причиной ее применения стало повышение мягкости. Изначально электростимуляция стала использоваться в Новой Зеландии, где быстрое охлаждение и замораживание бараньих туш, предназначенных на экспорт, вызывало холодовое сокращение, окоченение при размораживании и повышение жесткости мяса [90]. Кроме того, электростимуляция эффективна для повышения мягкости мяса и в отсутствие холодового сокращения. Механизм такой тендеризации мяса рассмотрен в работе [93]. В качестве такого механизма предлагается считать разрушение лизосом с последующим высвобождением эндогенных протеаз. Основан этот механизм на повышении активности лизосомных ферментов после электростимуляции. Тем самым частично повышение мягкости вызывается увеличением протеолитической активности до начала и во время созревания мяса. Еще одним механизмом может быть физическое разрушение целостности миофибрилл, вызываемое сильным сокращением при электростимуляции [94]. На сделанных с помощью электронного микроскопа снимках образцов мяса из туш, подвергавшихся электростимуляции, хорошо видны зоны сильного сокращения (контрактурные полосы) и чрезмерное удлинение соседних с ними миофиламентов. Из-за физических размеров толстых и тонких филаментов в результате проникновения толстых филаментов в Z-диска и взаимодействия с тонкими филаментами соседних саркомеров происходит сокращение длины саркомера более чем на 40% [89]. При этом для компенсации этих сверхсжатых зон другие области должны растягиваться и/или разрываться, в результате чего мясо становится более мягким. Несмотря на то что для обоснования физического разрыва данных еще недостаточно, предлагаемый механизм хорошо согласуется с другими примерами тендеризации мяса, связываемыми с избыточным сокращением мышечных волокон.

Считается, что положительный эффект от электростимуляции обусловлен ускорением посмертного преобразования мышечной ткани в мясо. Фактически электростимулированные туши достигают максимального качества быстрее, что позволяет фирмам-упаковщикам увеличивать производительность при сохранении требуемого качества или повышать качество при сохранении тех же объемов производства [92]. В тех случаях, когда от качества зависит система ценообразования, каждая товарная единица становится для упаковщика экономически более выгодной, а это еще более способствует внедрению электростимуляции в мясоперерабатывающей промышленности.

16.6. Химические изменения в мясе при консервировании

Подверженность мышечных тканей микробиологической порче требует применения физических или химических методов консервирования мяса. Наиболее эффективными средствами задержки роста микроорганизмов и минимизации химических процессов порчи мяса и мясных продуктов являются охлаждение,

холодильное хранение и замораживание. Традиционно свежее мясо консервируют посолом и частичной дегидратацией (сушкой, вялением), в результате чего повышается осмотическое давление и снижается активность воды, подавляя рост микроорганизмов. Относительно новыми методами консервирования являются обработка облучением и высоким давлением, и эти методы уже начинают применяться в мясоперерабатывающей промышленности. С другой стороны, для увеличения срока годности мяса становятся все более популярными нетрадиционные виды упаковки, в частности упаковка в модифицированной газовой среде. Все эти способы консервирования воздействуют не только на микроорганизмы, но и на химические свойства мяса и мясных продуктов.

16.6.1. Охлаждение и холодильное хранение

На типичном упаковочном предприятии в целях минимизации роста микроорганизмов полутуши животных быстро охлаждают до 2–5 °С в охлаждающем туннеле или ином охладителе; тушки птицы (бройлеров) и рыбы обычно охлаждают иммерсионным методом (путем погружения в ледяную взвесь). Продолжительность охлаждения еще теплой туши до конечной температуры охлажения может быть разной в зависимости от размера туши, толщины слоя подкожного жира и способа охлаждения — для тушки бройлера, охлаждаемой иммерсионным методом, она составляет около 1 ч, а для говяжьей туши весом 300 кг требуется до 24 ч. В некоторых упаковочных цехах для облегчения процесса охлаждения применяют орошение туш холодной водой и высокоскоростной обдув холодным воздухом. Скорость охлаждения влияет на ход ферментативных реакций в мышечной ткани после убоя, которые, в свою очередь, обусловливают качество созревшего мяса. К основным биохимическим изменениям на начальной стадии преобразования мышечной ткани в мясо относятся снижение значения pH (из-за гликолиза), распад АТФ и мышечные сокращения, обусловленные ферментативными процессами. По мере быстрого охлаждения туш из-за ингибирования активности ферментов эти биохимические изменения замедляются. Кроме того, при температурах охлаждения замедляется окисление липидов из-за пониженной активности оксиляющих ферментов. Ингибирование окисления липидов обычно помогает сохранить вкус и запах свежего мяса и минимизировать окисление миоглобина. Вместе с тем пребывание мышечной ткани (в состоянии, предшествующем ригору) в условиях низких температур может негативно сказаться на мягкости мяса из-за чрезмерной мышечной контрактации или посмертного окоченения (особенно это касается красного мяса). Для минимизации холодового сокращения необходимо в ходе охлаждения оставить мясо на кости, особенно на ранних стадиях послеубойного хранения. Поскольку активность основных эндогенных протеаз, участвующих в тендеризации мяса в ходе послеубойного созревания (в частности, кальпаина и катепсинов), при низких температурах существенно снижается, необходимо правильно осуществлять созревание туш или мяса до достижения приемлемой степени тендеризации.

16.6.2. Замораживание

Одним из наиболее эффективных методов консервирования мяса является замораживание. При хранении мяса и мясных продуктов при температурах ниже –10 °С рост микроорганизмов и ферментативные реакции практически прекращаются и, следовательно, минимизируются потери качества. Тем не менее, в ходе замораживания, хранения и последующего размораживания могут происходить физические и химические реакции. К химическим изменениям мяса в ходе хранения относятся обесцвечивание и развитие окислительной прогорклости, обусловленные соответственно окислением миоглобина и ненасыщенных жиров, а также повышение жесткости текстуры из-за денатурации и агрегации белков. На эти негативные изменения влияют скорость замораживания и размораживания, колебания температуры в морозильной камере при хранении, а также атмосферные условия вокруг замороженного мяса. Что касается замороженных переработанных мясных продуктов, то на их качество и срок хранения влияют также добавленные ингредиенты (например, соль) и способ обработки — измельчение, нарезка, эмульгирование и реструктурирование. Для ингибирования окисления замороженных мясных продуктов, обусловленного действием соли, в них зачастую добавляют антиоксиданты.

Основным побочным эффектом замораживания мяса является денатурация белков, вызываемая их физическим разрушением под действием кристаллов льда и химических реакций, связанных с дегидрата-

цией, а также концентрированием в мышечной ткани растворенных веществ. Такая денатурация белков особенно заметна при медленном замораживании. При низких скоростях замораживания внешний слой жидкости в мышечных волокнах охлаждается быстрее внутреннего, и когда переохлажденная внеклеточная жидкость достигает критической температуры, из нее выделяются растворенные вещества и образуются кристаллы льда. По мере кристаллизации воды увеличивается концентрация внеклеточных солей, и в клеточной мембране возрастает градиент осмотического давления [95]. Для предупреждения денатурации белков в мясо перед замораживанием вносят особые вещества-криопротекторы, например, полифосфаты и полиолы (сорбит, сахарозу, декстрин и др.).

Скорость замораживания обусловлена применяемыми методами. Ее можно представить в следующей последовательности:

криогенное замораживание > замораживание в быстродействующем морозильном аппарате > замораживание без движения воздуха (*still-freezing*).

Криогенное замораживание, при котором используют сжиженные газы, в частности жидкий азот (температурой −195 °C) или сухой лед (температурой −98 °C), позволяет быстро заморозить мясо до отрицательных температур и в течение нескольких минут преобразовать жидкую водную фазу в кристаллы льда. Замораживание в быстродействующем морозильном аппарате (с высокой скоростью движения потоков воздуха температурой, например, −50 °C) также обусловливает ускоренную теплопередачу и позволяет эффективно сформировать кристаллы льда. Что касается замораживания без движения воздуха, то в этом случае теплота из мяса отводится медленно, из-за чего могут повредиться клетки мышечной ткани и белки. Как правило, ускоренное замораживание способствует образованию мелких кристаллов льда, однородно распределенных внутри и вне мышечных клеток, тогда как при более медленном замораживании образуется меньшее число более крупных кристаллов льда, в основном внеклеточных.

Относительно новой технологией замораживания мяса является «*pressure-shift freezing*» (замораживание со сбросом давления). Образцы мяса охлаждают до температур около – 20 °C при некотором повышенном давлении и дальше не замораживают. При резком снятии давления в мышечной ткани происходит мгновенная спонтанная микрокристаллизация. Считается, что в таком мясе происходят минимальные изменения ультраструктуры, снижается денатурация белка и улучшается качество продукта [96, 97].

16.6.3. Обработка под высоким давлением

Обработка под высоким давлением бывает полезна не только для консервирования мяса, но и вообще при выпуске высококачественных мясных продуктов. В этом случае для уничтожения патогенных микроорганизмов и инактивации нежелательных ферментов в мясе перед хранением применяют гидростатическое давление от 100 до 800 МПа. Нетермические методы обработки под давлением применяются также для обработки готовых к употреблению мясных изделий в упаковке, в частности деликатесной мясной нарезки, в целях исключить возможную их контаминацию листериями (*Listeria monocytogenes*). Благодаря низкой энергии сжатия (например, 19,2 кДж на 1 л воды под давлением 400 МПа), ковалентные связи обычно не разрушаются. Вместе с тем обработка под высоким давлением может нарушать электростатические и гидрофобные белковые взаимодействия, тем самым делая их менее стабильными. Поскольку подобные технологии не зависят от температуры и внесенных добавок, продукты хорошо сохраняют свой вкус и аромат.

Физические изменения в мышечной ткани под действием высокого давления включают уменьшение объема водной фазы и снижение значения pH, обратимые после снятия давления. Вместе с тем даже кратковременное действие этих изменений может существенно изменить структуру белков и их связи с небелковыми соединениями. Давление выше 100 МПа может привести к распаду четвертичной структуры белка на подъединицы, к раскрытию мономерной структуры, а также к агрегации белков и гелеобразованию [98, 99]. При обработке под высоким давлением тяжелые цепи миозина расщепляются на мономеры с одной головкой, после чего образуются агрегаты по принципу «голова-к-голове» [100]. Считается, основную роль в раскрытии, диссоциации, агрегировании и гелеобразовании мышечных белков играют происходящие под давлением изменения в объеме водной фазы. Подвергнутые действию высокого давления мышечные белки (например, в сурими) способны к гелеобразованию при обычной температуре, что

обусловлено повышенным высвобождением боковых звеньев с гидрофобной стороны и, соответственно, облегчением агрегации белков.

Обработка под высоким давлением мышечной ткани до наступления посмертного окоченения увеличивает скорость гликолиза и контрактацию волокон благодаря действию многих факторов, в том числе разрушения саркоплазматического ретикулума, в котором обычно сосредоточены запасы кальция, и утратой активности Са-АТФазы. Высокая цитозольная концентрация ионов кальция активирует ферменты, задействованные в гликолизе (например, фосфорилазкиназу) и в мышечном сокращении (например, миозин-АТФазу). При достаточно высоком давлении (более 400 МПа) происходит обесцвечивание сырого мяса, проявляющееся в повышенном значении L^* и пониженном значении a^* [98]. Фактически действие высокого давления на сырое мясо из-за окисления гемового железа и денатурации глобина приводит к повышению содержания коричневого метмиоглобина за счет красного миоглобина.

Давление выше 150 МПа может привести к существенным изменениям структуры саркомера, в частности, к полному исчезновению М-линии и Н-зоны, а также к нарушению целостности филаментов I-полоски. Как ни странно, эти структурные нарушения, похоже, никак не влияют на повышение мягкости мяса, что может быть обусловлено утолщением Z-дисков костамеров и потерей активности протеаз [101]. С другой стороны, обработка под высоким давлением не затрагивает структуру коллагена.

В говядине, обработанной высоким давлением, содержание μ-кальпаина при созревании существенно снижается [102]. И μ-кальпаин, и *m*-кальпаин при давлении 200 МПа частично инактивируются, а полностью они инактивируются при давлении 400 МПа. Этот негативный эффект вызывается обусловленной высоким давлением денатурацией белков и увеличением автолиза кальпаинов из-за высокой концентрации цитозольных ионов кальция, высвобожденных из саркоплазматического ретикулума. С другой стороны, использование высокого давления повышает катептическую активность пептидаз (*B, D, L, H*) благодаря разрушению лизосомной мембраны. Увеличения высвобождения катепсинов из лизосом вполне достаточно для преодоления денатурации, происходящей под действием высокого давления. Тем не менее, такая повышенная катептическая активность не способна компенсировать снижение мягкости мяса вследствие потери кальпаина и структурных изменений мышечных волокон. Именно поэтому можно предупредить размягчение мышечной ткани рыб, происходящее при хранении из-за повышенной протеолической активности, путем обработки рыбы под высоким давлением, инактивирующей эндогенные протеазы, особенно лизосомные ферменты.

Для тендеризации мяса было разработано специальное пиротехническое оборудование, продуцирующее очень высокое давление, в частности методом *Hydrodyne*® [103]. Инкапсулированное свежее мясо помещают в герметичный заполненный водой контейнер, располагаемый ниже поверхности земли. При взрыве специального заряда, состоящего из жидкого и твердого взрывчатых веществ, образуется ударная волна, акустически близкая к влаге мышечной ткани. Эта ударная волна при контакте с поверхностью мяса создает сверхвысокое давление (около 680 атм). У мяса, подергаемого такой обработке, намного повышается мягкость и сокращается продолжительность необходимого созревания. Этот размягчающий эффект обусловлен разрушением миофибрилл, включая Z-диски. Данный метод также инактивирует микроорганизмы, что является дополнительным преимуществом для консервирования свежего мяса и повышения его безопасности для здоровья.

16.6.4. Обработка облучением

В мясной индустрии в последнее время находит применение облучение мяса в целях инактивации патогенных микроорганизмов. Используют два типа излучений — ионизирующее и неионизирующее. У неионизирующего излучения, к которому относятся микроволновое и инфракрасное излучение, недостаточно энергии для ионизации атомов, и его действие основано на образовании теплоты, которая уничтожает микроорганизмы и, следовательно, этот метод пригоден для тепловой обработки мясных продуктов. В случае ионизирующего излучения, обусловленного потоком быстрых электронов или воздействием γ-излучения радиоактивных изотопов, атомы начинают ионизироваться, благодая чему микроорганизмы погибают более эффективно. Допустимые дозы облучения составляют для мяса птицы 1,5–3,0 кГр, а для говядины — 7,0 кГр.

Облучение γ-лучами сырого и свежего мяса стало уже проверенным методом обработки. Несмотря на то что этот метод доказал свою эффективность как средство снижения контаминации мяса микроорганиз-

мами, он связан также с некоторыми негативными изменениями в мышечной ткани из-за происходящего радиолиза. Так, облучение γ-лучами свежего мяса может привести к образованию супероксидных и гидроксильных радикалов. Эти первичные радикалы обладают высокой реакционной способностью и могут вступать в реакции с жирами и белками мышечной ткани, образуя вторичные радикалы и продукты распада жиров и белков. В отличие от небольших радикалов, срок существования которых в водной фазе мяса невелик, белковые радикалы живут дольше и могут сшиваться друг с другом, что приводит к повышению жесткости мышечной ткани. С другой стороны, расщепление ненасыщенных жиров в мышечной ткани после воздействия γ-лучей приводит к продуцированию различных веществ, в частности алкенов, и карбонильных соединений, участвующих в образовании побочного привкуса и запаха у обработанных продуктов. При обработке γ-излучением образуются также летучие соединения серы, что обусловлено радиолитическим расщеплением боковых звеньев метионина и цистеновых остатков. Эти соединения являются основными летучими соединениями, создающими побочный привкус и запахи у обработанного облучением красного мяса и мяса птицы в вакуумной упаковке [104].

Еще одним последствием обработки γ-излучением является обесцвечивание. Облученное мясо может приобрести непривлекательный зеленоватый или коричневый оттенки, обусловленные, по всей видимости, разрушением порфириновой структуры гема или образованием сульфомиоглобина [105]. У светлого мяса, в частности, у куриных грудок, может появляться выраженный розоватый оттенок вследствие образования комплекса «миоглобин–монооксид углерода» [106]. Поскольку химические превращения под действием γ-лучей обычно обусловлены образованием пероксидных радикалов, негативные последствия такой обработки для качества готовой продукции можно минимизировать путем применения вакуумной упаковки или внесением соответствующих водо- и жирорастворимых антиоксидантов.

16.7. Химические изменения в переработанных мясных продуктах

При переработке мяса в целях расширения ассортимента мясных продуктов, увеличения их срока годности и облегчения употребления применяются различные виды физической, химической и тепловой обработки мышечных тканей. При этом происходят существенные изменения физико-химических свойств свежего мяса. Переработанные мясные продукты можно разделить на три основные категории:

1) продукты с минимальными изменениями структуры мышечной ткани, например, соленая ветчина, бекон и корнд-биф (солонина);
2) продукты с умеренным измененением структуры мышечной ткани, например, отбитые ломтики стейков;
3) продукты из измельченного мяса (например, колбасы, сосиски и различные типы фарша, в частности, ланчен-мит).

Химические изменения в мышечных тканях определяются применяемым способом переработки и добавляемыми ингредиентами. Так, формирование стабильной розовато-красной окраски соленой ветчины обусловлено химической реакцией оксида азота с миоглобином; образование стабильных глобул жира в продуктах эмульсионной природы — взаимодействием белков и жиров на границе раздела водной и жировой фаз, а прочность и гладкая текстура бескостного окорока из индейки обусловлена взаимодействем миофибриллярных белков, экстрагированных солью и фосфатом, и их желированием.

16.7.1. Посол

Термином «посол» обозначают обработку свежего мяса путем внесения соли и нитрита (или нитрата) в целях консервирования и получения требуемых цвета, вкуса и аромата. Технологии посола мяса восходят к далекой древности, примерно к 3000 г. до н. э. У посоленного мяса характерные розоватый цвет и выраженный запах. К подобным продуктам относятся такие традиционные мясные продукты, как ветчина, бекон, «летние» колбасы типа сервелатов и многочисленные готовые к употреблению изделия, широко представленные в холодильных витринах супермаркетов, в том числе нарезка ветчины из мяса индейки или деликатесные болонские колбаски.

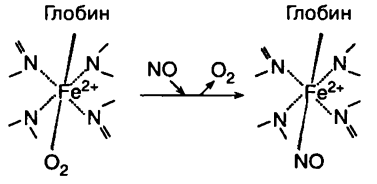
Для посола мяса используют обычную соль — натрия хлорид (NaCl). Основной функцией соли помимо придания характерного вкуса является экстракция миофибриллярных белков и повышение осмо-

тического давления, которое предотвращает рост микроорганизмов и микробиологическую порчу продукта. Несмотря на то что в посоленных мясных продуктах соль является незаменимым ингредиентом, фактически действующим веществом является нитрит-ион (NO_2^-) или нитрат-ион (NO_3^-). Соли азотной кислоты (нитраты) изначально были разрешены к использованию в производстве посоленного мяса как фиксатор окраски, однако в настоящее время они повсеместно заменяются солями азотистой кислоты (нитритами), поскольку именно нитрит-ион является непосредственным предшественником оксида азота II (NO), основного действующего вещества посола. Применение нитрата в настоящее время ограничено продуктами сухого посола типа «деревенской» ветчины и сухих колбас. В производстве таких изделий нитрат-ион под действием микроорганизмов или соединений-восстановителей медленно превращается в нитрит-ион, благодаря чему реакции посола протекают медленнее (считается, что при этом достигается более стабильный цвет и лучший вкус и аромат).

Нитрит — соединение многофункциональное. Он индуцирует образование и стабилизирует розоватый цвет нежирного мяса, участвует в образовании характерного вкуса и аромата посоленных мясных продуктов, ингибирует рост патогенных микроорганизмов (особенно *Clostridium botulinum*) и микроорганизмов порчи, а также задерживает развитие окислительной прогорклости. Характерный для посоленных мясных продуктов розоватый цвет обусловлен реакцией гема миоглобина с оксидом азота, в результате которой образуется нитрозилмиоглобиновый пигмент. Оксид азота продуцируется из нитрита в присутствии восстанавливающих соединений типа эриторбовой кислоты. Из растворенной в воде части нитрита образуется азотистая кислота (HNO_2). При восстановлении эта азотистая кислота распадается до оксида азота, и когда последний связывается с железом гема, меняется распределение электронов в структуре гема, что и приводит к появлению розоватой окраски. При нагревании нитрозилмиоглобин преобразуется в нитрозилгемохромоген, более стабильный благодаря денатурации глобина.

$$NaNO_2 + H_2O \rightarrow HNO_2 + NaOH$$

$$3\,HNO_2 \rightarrow HNO_3 + 2\,NO + H_2O$$



Восстанавливающие соединения вносят в приготовленную для посола мясную смесь в целях ускорения формирования цвета путем превращения нитрит-ионов в оксид азота, а ионов трехвалентного гемового железа — в ионы двухвалентного железа. Наиболее распространенным восстанавливающим соединением является эриторбовая кислота (изомер аскорбиновой кислоты) и ее натриевая соль — эриторбат натрия. В мышечной ткани также содержатся эндогенные восстановители (например, цитохромы, хинины и *NADH*); кроме того, мышечная ткань обладает ферментативной восстанавливающей активностью, однако восстановительная способность этих соединений относительно невелика. Помимо восстановления метмиоглобина (Fe^{3+}) до миоглобина (Fe^{2+}) и нитрит-иона до оксида азота, соли эриторбовой кислоты действуют как антиоксидант и стабилизируют цвет, вкус и аромат, а также снижают образование нитрозаминов. Другими добавками при посоле являются фосфаты (пирофосфат натрия, триполифосфат и гексаметафосфат), которые участвуют в реакциях посола не напрямую — они лишь повышают ВУС мышечной ткани и способствуют повышению стойкости к окислению путем образования хелатных комплексов с ионами металлов.

16.7.2. Гидратирование и удерживание влаги

Как мы уже отмечали в предыдущих разделах, вода составляет 70–80% массы свежего мяса, а в инъецированном (шприцованном) мясе ее содержание может быть выше 85%. Содержание влаги в мясе после тепловой обработки определяет сочность готового продукта и его мягкость. Влага в мясе присутствует

как в связанной, так и в свободной форме. Связанная вода прочно удерживается белками посредством водородных связей, количество которых зависит от поверхностного заряда и полярности белка. Свободная вода удерживается в различных компартментах мышечной ткани капиллярными силами (например, в пространстве между мышечными филаментами, между миофибрилами и между волокнами). Большую часть влаги в мясе составляет вода в свободной форме (70–90%). В измельченном мясе большая часть воды удерживается в матриксе миофибриллярного протеинового геля. Условия, ведущие к денатурации белка (при хранении в замороженном состоянии, окислении и быстром накоплении кислоты в состоянии *post mortem*, пока температура мышечной ткани остается еще высокой), снижают количество связанной воды в мясе. Примером мяса со слабой влагосвязывающей способностью (ВСС) служит свинина *PSE* и мясо индейки (см. предыщие разделы).

Способность переработанного мяса к связыванию, иммобилизации и удержанию нативной и экзогенной воды во многом обусловлена миофибриллярными белками, функциональные свойства которых зависят от внесенных ингредиентов. Для маринования или шприцевании мяса довольно часто применяют высокие концентрации растворов одновалентных солей (натрия или калия хлорида), то есть рассолов. Гидратирование и удержание добавленной воды становится возможным благодаря расширению миофибрилл под действием натрия хлорида из-за сил электростатического отталкивания и разбухания [107]. Для повышения ВУС мяса вместе с солью используют различные фосфатные соединения, в том числе пирофосфат, триполифосфат и гексаметафосфат натрия. В инъецированном свежем мясе обычно содержатся как натрия хлорид (0,5–2,0%), так и фосфаты (0,25–0,40%). При использовании щелочных фосфатов достигаются дополнительные преимущества из-за повышения значения pH мяса с примерно 5,5–5,6 (значений, близких к изоэлектрической точке актомиозина) до 5,8–6,0, при которых миозин и другие мышечные белки лучше связывают воду благодаря увеличению общего заряда. Некоторое повышение зиачения pH обычно также обусловливает расширение межфиламентных промежутков благодаря силам электростатического отталкивания, что способствует иммобилизации внесенной воды.

Механизм гидратирования мяса с помощью натрия хлорида и фосфатов не ограничивается рамками простого действия сил электростатического отталкивания. Помимо увеличения сил отталкивания между соседними миофиламентами, высокие концентрации натрия хлорида (например, более 2,5%) способны вызвать диссоциацию миозиновых филаментов с образованием крупного полипептидного матрикса, удерживающего влагу [108]. Более того, при повышенных концентрациях натрия хлорида изоэлектрическая точка миозина сдвигается к более низким значениям pH из-за экранирования положительных зарядов ($-NH^+_3$) белков хлорид-ионами. В результате у миозина (или актомиозина) в мясе с нормальным значением pH будет больший положительный заряд (рис. 16.18). Увеличение межпептидных сил электростатического отталкивания приводит к усилению взаимодействия между белками и водой и повышению ВУС мяса. С другой стороны, низкие концентрации пиро- и триполифосфата (менее 0,5% или 5–15 мМ) способны диссоциировать актомизиновый комплекс. В присутствии магния диссоциирующее действие пирофосфата очень близко к действию АТФ. Отделение актиновых филаментов от миозиновых позволяет воде быстрее диффундировать в межфиламентное пространство. Подобная диссоциация также повышает мягкость мяса. Существенное разбухание мышечных волокон наблюдается при повышении концентрации натрия хлорида с 0,1 примерно до 0,6 М в отсутствие фосфатов или до 0,4 М в их

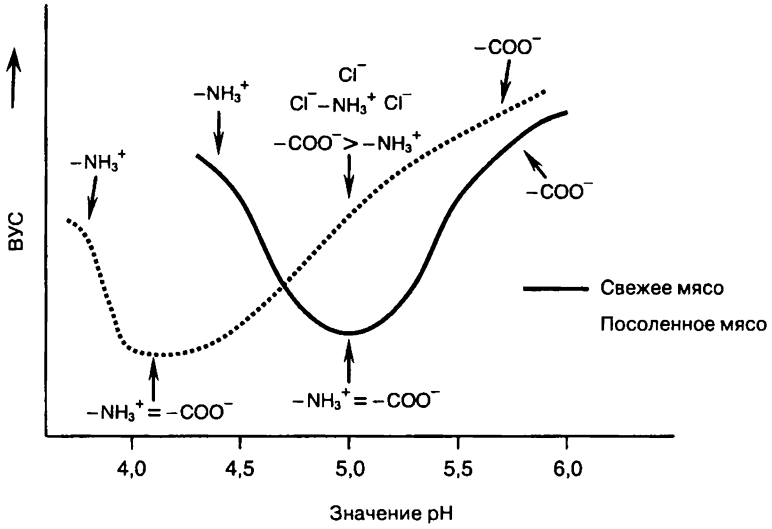


Рис. 16.18. Схематическое представление зависимости между значением pH и ВУС белков в свежем и посоленном мясе

присутствии [109]. Разбухание и гидратирование продолжаются до достижения концентрации натрия хлорида 1,0 М (около 4,0% массы мышечной ткани), когда разбухшее волокно начинает сжиматься под действием эффекта высаливания.

Гидратирование мяса, обработанного посолом и фосфатами, сопровождается частичной экстракцией миофибриллярных белков. Селективное удаление белков из миофибриллярного каркаса может понадобиться для разбухания белковых филаментов. По данным фазово-контрастной микроскопии «разбухание» миофибрилл и удаление белков из толстых филаментов (миозиновых) в рассолах с концентрацией натрия хлорида 0,6–1,0 М происходит одновременно [107]. Добавление 10 мМ пиро- или триполифосфата намного облегчает процесс гидратирования и приводит к экстракции миозина с концов А-полос, где он сшит с актином. Более того, экстракция полипептидов с поперечной структурой, в частности, М-, Х- и С-белков в присутствии натрия хлорида и фосфатов, способствует ослаблению миофибриллярной решетки и впитыванию влаги в мышечные волокна [110, 111].

16.7.3. Образование белкового гелевого матрикса

Белковое гелеобразование — это физико-химический процесс, происходящий в реструктурированных и измельченных мясных продуктах. Образование геля не только делает частицы и кусочки мяса более клейкими, но и играет важную роль в связывании воды, вкусоароматических соединений и жиров в мясных продуктах после тепловой обработки. Гелеобразование в продуктах из нагретых мышечных тканей происходит последовательно в три стадии. После начального раскрытия (денатурации) отдельных молекул белка происходит их агрегация, преимущественно путем гидрофобных взаимодействий, а на последней стадии мелкие белковые агрегаты или олигомеры сшиваются друг с другом, формируя нити, образующие непрерывную упругопластичную сеть [112]:

$$\chi P_N \xrightarrow[\text{Денатурация}]{\text{Нагревание}} \chi P_D \xrightarrow[\text{(агрегация)}]{\text{Нагревание}} (P_D)_\phi, (P_D)_\psi, \ldots \xrightarrow[\text{(перекрестная сшивка)}]{\text{Нагревание/Охлаждение}} (P_D)_\phi - (P_D)_\psi -$$

где χ — общее количество белковых молекул; ϕ и ψ ($\phi + \psi + \ldots = \chi$) — количество молекул, агрегированных в заданной точке процесса гелеобразования; P_N — нативный белок; P_D — денатурированный белок.

Примерами желированных мясных продуктов могут служить болонские колбаски, франкфуртские сосиски и различные виды мяса для завтрака (ланчен-мит), приготовляемые из мясного фарша (измельченной мышечной ткани). Благодаря своей адгезионной способности гель, образовавшийся между комочками мясного фарша, во многом обеспечивает целостность продукта и его способность к нарезке (например, у бескостной ветчины или роллов из мяса индейки).

Белки саркоплазматической и соединительной тканей (стромальные) в общем явлении гелеобразования в переработанных мясных продуктах играют лишь небольшую роль. Большинство саркоплазматических белков при нагревании посоленного мяса до 40–60 °С быстро коагулируют и не образуют упорядоченной, функциональной гелевой структуры. Больше всего известен частично гидролизованный коллаген (желатин), и его гелеобразование относительно независимо от ионной силы. Желатин образует обратимые хладонабухающие гели, стабилизированные посредством водородных связей. Вместе с тем диссоциация и разложение коллагена до растворимого желатина (желирующего соединения) требуют длительного нагревания в присутствии воды, то есть условий, практически не применяемых в производстве продуктов из мышечных тканей. С другой стороны, миофибриллярные белки в целом являются отличными желирующими белками и играют важную роль в формировании требуемых текстурных свойств переработанных мясных продуктов. Гелеобразующая способность системы миофибриллярных белков во многом обусловлена свойствами миозина (в состоянии, предшествующем посмертному окоченению) и актомиозина (после посмертного окоченения) [113].

Для образования геля необходимо сначала экстрагировать миофибриллярные белки, что обычно инициируется путем посола мяса (натрия или калия хлоридом) и введения в него фосфатов. Гелеобразующие свойства миофибриллярных белков зависят от структуры этих белков, размера их молекул, содержания, происхождения или типа мяса, а также от технологических условий (значения pH, ионной силы и скорости нагревания). Так, миозин, для которого характерно наибольшее соотношение длины молекулы к ее

диаметру (100 нм на 1,5–2 нм), способен образовывать высоковязкоэластичный гель, тогда как актин (глобулярный белок, по размеру составляющий одну десятую миозина) обладает слабыми гелеобразующими свойствами [114], хотя и может упрочнять миозиновые гели при соотношении миозин : актин (масс./масс.) около 24 [115]. Миофибриллярные белки из белых мышечных волокон образуют более прочные гели, чем белки из красных мышечных волокон, что приписывают различиям физико-химических свойств изоформ миозина [116]. Этим же можно объяснить, например, почему при одинаковых технологических условиях из куриной мышечной ткани *pectoralis major*, состоящей исключительно из белых мышечных волокон, и ее миозиновых или смешанных миофибриллярных белков, получаются более прочные гели, чем из красной куриной мышечной ткани *gastrocnemius*. Еще одним уникальным свойством миофибриллярных белков является то, что наиболее прочные гели они образуют при значениях pH около 6,0, но оптимальное значение pH несколько варьирует в зависимости от типа мышечной ткани и вида животного.

Механизм гелеобразования миофибриллярных белков, индуцированного нагреванием, во многом зависит от миозина, основного гелеобразующего компонента солевого экстракта переработанного мяса. При типичных режимах переработки (pH 6,0, содержание натрия хлорида 0,6 М или 2,5%) гелеобразование начинается с раскрытия участка S-1 тяжелого меромиозина (*HMM*) при нагреве протеинового золя до температуры примерно 35 °С, что приводит к гидрофобному ассоциированию путем взаимодействий «голова-к-голове» (рис. 16.19). Эти олигомеры затем коалесцируют при температуре около 48 °С и образуют межмолекулярные дисульфидные связи, обеспечивающие определенные эластичные свойства. При достижении температуры 50–60 °С происходят конформационные изменения легкого меромиозина (*LMM*, палочки), в результате чего формируется открытая структура с обнаженными гидрофобными участками и специфическими группами боковых звеньев. Такое структурное изменение обеспечивает временное снижение вязкоупругих свойств получившегося «полугеля». В случае актомиозина снижение прочности геля в этом промежуточном температурном диапазоне обусловлено также отделением актина. Тем не менее, продолжающееся ассоциирование *LMM* через взаимодействия «хвост-к-хвосту» при дальнейшем нагреве приводит к образованию прочных нитей и филаментных гелевых сетей, обладающих высокой эластичностью и влагосвязывающей способностью, причем эти сети стабилизированы дисульфидными связями.

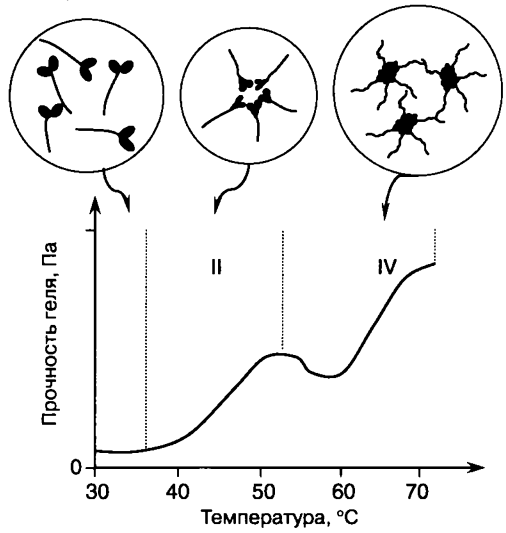


Рис. 16.19. Схематическое представление гелеобразования миозина при нагревании в растворе с 0,6 М натрия хлорида (значение pH 6,0). Показаны четыре температурных зоны: I — изменений в миозине не наблюдается; II — ассоциирование «голове-к-голове»; III — структурная перестройка миозиновых агрегатов вследствие раскрытия легкого меромиозина; IV — перекрестная сшивка миозиновых агломератов путем ассоциирования «хвост-к-хвосту»

На гелеобразвание миофибриллярных белков большое влияние оказывает микробная трансглутаминаза — фермент, катализирующий реакции переноса ацильных групп у сшитых белков путем образования глутамин-лизиновых мостиков. Внесение этого фермента в желирующий раствор приводит более чем к десятикратному увеличению прочности геля, так что он является прекрасным пищевым ингредиентом для производства мясных фаршей и сурими, где очень важна клейкость мясного компонента [117, 118].

16.7.4. Иммобилизация и стабилизация жира

В переработанных мясных продуктах, особенно в эмульгированных, жир находится в иммобилизованном и стабилизированном состоянии благодаря образованию на границе раздела фаз белковой мембраны и белкового матрикса. При измельчении или эмульгировании крупные частицы жира или адипозной ткани разрываются под действием усилия сдвига на мелкие гранулы. По мере образования этих мелких жировых глобул они покрываются слоем белков, которые по своей природе амфотерны, то есть обладают и гидрофобными, и гидрофильными группами (свойствами). Неполярные группы проникают в жировую фазу (гидрофобную), а полярные — в водную фазу, образуя на границе раздела фаз пленку, разделяющую

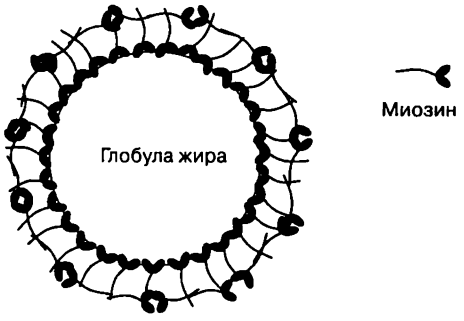


Рис. 16.20. Схематическое представление миозинового монослоя вокруг глобулы жира в мясных эмульгированных продуктах

несмешивающиеся фазы (жировую и водную). Адсорбция белка к поверхности жировых глобул снижает энергию на границе раздела фаз, а денатурация этого адсорбированного белка ведет к образованию белкового гелевого матрикса, причем оба этих явления повышают стабильность эмульсии. Относительную эмульгирующую способность мышечных белков может выразить следующей последовательностью: миозин > актомиозин > саркоплазматические белки > актин [119]. Прекрасные эмульгирующие свойства миозина относят на счет уникальной структуры его молекулы (высокое соотношение ее длины к диаметру), а также его биполярной природы (гидрофобная «голова» и гидрофильный «хвост»). Предполагаемая монослойная пленка на границе раздела фаз, формируемая преимущественно миозином, схематически изображена на рис. 16.20.

Жировые глобулы тонкоизмельченного мяса, обычно называемого «фаршем тонкого измельчения», гомогенно распределены в непрерывной комплексной водной фазе, содержащей солерастворимые белки, миофибриллы, кусочки мышечных волокон и соединительной ткани, фрагменты коллагена и другие взвешенные в воде ингредиенты. В таком тонком фарше действуют два механизма стабилизации эмульсии — формирование белкового покрытия на поверхности частиц жира для снижения сил поверхностного натяжения и иммобилизация частиц жира в белковом матриксе преимущественно за счет их физического захвата. Это покрытие, то есть своего рода белковая мембрана вокруг глобул жира, не гомогенно, но по своей природе многослойно. В толстых белковых пленках фарша тонкого измельчения различаются три отдельных протеиноподобных слоя [120], которые описываются как тонкие внутренние слои, покрывающие поверхность глобулы жира, вероятно, в результате отложения белков на миозиновый или актомиозиновый монослой (см. рис. 16.20). Этот самый внутренний слой связан через участки диффузии с другим слоем аналогичной плотности, который, в свою очередь, связан с более толстым диффундированным белковым покрытием, в результате чего получается белковая мембрана со стабильной структурой.

Аналогичным образом стабилизация жира белковым гелевым матриксом представляет собой комплексный физико-химический процесс, поскольку желирующий раствор, называемый белковым золем, — это не просто белки, суспендированные в водном растворе. Этот золь является скорее гетерогенным матриксом, состоящим из растворимых белков и нерастворимых гидратированных миофибрилл или фрагментов мышечных волокон. Зачастую в нем присутствуют и немясные ингредиенты (соевые белки, крахмал, пряности и т. п.). Тем самым образовавшийся после тепловой обработки гель можно рассматривать как своего рода композитную систему, где взаимодействуют агрегаты из экстрагированных миофибриллярных белков, фрагменты миофибрилл и глобулы жира, покрытые белковым слоем, что приводит к образованию переплетенной сети. Некоторые нерастворимые фибриллы могут удлиняться по мере образования геля, тогда как глобулы жира могут действовать как своего рода наполнители пустого пространства этого гелевого матрикса, тем самым упрочняя гель. Такой белковый гель стабилизируется при сочетанном действии разных сил, включая гидрофобные и электростатические взаимодействия, водородные связи, Ван-дер-ваальсовы силы и ковалентные связи, преимущественно через дисульфидные мостики. Ковалентные связи типа дисульфидных мостиков, похоже, играют очень малую роль, за исключением процессов окисления.

Детерминантами стабильности эмульсии являются физико-химические и реологические свойства мембран жировых глобул и непрерывных белковых матриксов, которые зависят от многих факторов, в том числе значения pH, вязкости водной фазы, времени и температуры измельчения или эмульгирования, а также соотношения нежирного мяса и жира. Состав и свойства мембран жировых глобул и непрерывной водной фазы можно модифицировать с помощью внесения иных ингредиентов и пищевых добавок в целях повышения стабильности эмульсии и предотвращения коалесценции при высоких температурах. Стабилизации эмульсионной системы способствуют гидролизованная соя, глютен и сывороточные белки, поскольку эти ингредиенты повышают прочность мембраны на границе раздела фаз и всего белкового матрикса. Обработка эмульгирующих белков перед эмульгированием микробной трансглутаминазой по-

вышает стабильность эмульсии и, кроме того, позволяет аморфной эмульсии после нагревания сформировать стабильный гелевый матрикс [121]. Считается, что этот фермент действует благодаря усилению взаимодействия и сшивки мембран жировых глобул, а также путем взаимодействия глобул жира с сегментами белковой сети гелевого матрикса.

16.7.5. Реструктуризация мяса

Из реструктурированного мяса изготавливают большое число мясных продуктов слегка измененной формы, которые по своей текстуре напоминают непереработанное мясо — стейки, котлеты и т. п. К подобным продуктам относятся и многочисленные готовые к употреблению мясные продукты, в том числе популярное «мясо для завтрака» («ланчен-мит»). Реструктурированные мясные продукты можно разделить на три основные группы по использованному методу переработки и размеру частиц мяса, то есть по степени измельчения: резаные и сформованные (с цельными мышечными волокнами или группами волокон), формованные продукты грубого измельчения (с крупными кусками мяса) и строганые формованные продукты (из мясной стружки замороженного мяса).

Независимо от способа измельчения мяса единственным важным фактором для производства мясных продуктов является внесение и действие соли (натрия хлорида), которая требуется для экстракции миофибриллярных белков, особенно миозина и актомиозина. Такой белковый экстракт представляет собой очень вязкий, липкий экссудат, обеспечивающий адгезию частиц мяса друг к другу. Для эффективного их связывания, однако, этот белковый экстракт необходимо преобразовать в вязкопластичный полутвердый матрикс, то есть гель или «полугель». Это происходит под воздействием нагревания при тепловой обработке сформованного мясного продукта. Экстракция солерастворимых миофибриллярных белков осуществляется при перемешивании мяса с не менее чем 0,5 М натрия хлорида в механической мешалке (массажере или установке для тумблирования). Тумблирование основано на действии сил земного притяжения и трения при падении подбрасываемых кусков мяса друг на друга в целях экстракции миофибриллярных белков, тогда как массажирование основано преимущественно на трении частиц мяса между собой и вращающимися лопастями массажера. Одновременно с внесением натрия хлорида используют и полифосфаты, повышающие экстракцию белков и влагоудерживающую способность мяса. В смесь реструктурированного мяса добавляют также другие ингредиенты — специи, обезжиренное сухое молоко, концентрат сывороточного белка, соевую муку и нитриты, которые подчеркивают вкус и аромат, а также усиливают влагосвязывающую способность, улучшают текстуру, внешний вид изделий и их способность к нарезке.

В производстве реструктурированных свежих стейков из говядины и эскалопов из свинины успешно применяется микробная трансглутаминаза [122]. Этот фермент образует ковалентные сшивки между глутаминовыми и лизиновыми боковыми звеньями, связывая тем самым частицы мяса между собой. Мясные продукты, реструктурированные без нагревания, бывают самого разного вида и по-разному порционированными.

16.7.6. Химия сурими

Сурими — это грубый концентрат миофибриллярного белка, приготавливаемый путем промывания измельченной бескостной мышечной ткани рыб в целях удалениях саркоплазматических компонентов и жира с последующим смешиванием с криопротектантами (как правило, полиолами) для предупреждения денатурации белка в ходе хранения в замороженном состоянии. Сурими представляет собой своего рода «полуфабрикат», так как затем его перерабатывают либо на различные «камабоко» (рыбные пирожки) и другие аналоги морепродуктов типа имитации мяса крабов и омаров, либо используют в качестве ингредиента в других продуктах.

Основная проблема обеспечения качества сурими заключается в широком видовом разнообразии рыб, используемых для его получения, так как для мышечных тканей рыб характерна высокая протеолитическая активность, отрицательно сказывающаяся на текстуре продуктов на основе сурими. В частности, при промывке зачастую трудно полностью удалить *B*- и *L*-катепсины, а также *L*-подобные протеазы. Эти эндогенные протеазы проявляют максимальную активность при температуре 45–55 °C, и тем самым они могут ухудшать текстурные свойства продуктов на основе сурими, подвергаемых тепловой обработке, из-за

разрушения актомиозина [123]. Предупредить размягчение геля в сурими можно с помощью сухого белка бычьей плазмы, яичного белка и картофельного экстракта, которые перемешивают с сурими перед тепловой обработкой. Небольшие пептиды (ингибиторы ферментативной активности), присутствующие в этих добавках, в качестве субстрата для протеаз конкурируют с белками мышечной ткани рыб. Поскольку большинство в «суперсемействе» катептических ферментов составляют цистеинпротеазы, для предупреждения размягчения геля сурими при тепловой обработке используют также цистатин (общий ингибитор катепсинов), который получают по рекомбинантной технологии [124].

Альтернативным традиционному способу получения сурими является метод кислотной или щелочной солюбилизации. В отличие от традиционной технологии приготовления сурими с использованием многократной промывки рыбного фарша в целях концентрирования миофибриллярного белка путем удаления жира и саркоплазматических компонентов, метод солюбилизации подразумевает либо кислотную (pH 2,5–3,5), либо щелочную (pH 9–10) обработку, при которой из гомогенизированной мышечной ткани солюбилизируются и миофибриллярные, и саркоплазматические белки. Эти растворенные белки затем выделяют методом изоэлектрического осаждения (при pH 5,0–5,5) [125]. Основное преимущество этого метода заключается в высоком выходе (более 90% по сравнению с 55–65% при традиционной промывке). Метод кислотной солюбилизации и изоэлектрического осаждения особенно полезен при переработке жирной рыбы с темным мясом.

Литература

1. Rollo R., Ubaldi M., Ermini L., Marota I. Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps // *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 2002, 99, p. 12594–12599.
2. Lawrie R. A. *Meat Science.* — 6th ed. — Lancaster, PA: Technomic Publishing, 1998.
3. *Composition of Foods Raw, Processed, Prepared* / U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. — USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Date Laboratory Home Page (http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/).
4. Allen C. E., Foegeding E. A. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods: A review // *Food Technol.* 1981, 35, p. 253–257.
5. Gray J. I., Pearson A. M. Lipid-derived off-flavors in meat formation and inhibition // *Flavor of Meat and Meat Products* / F. Shahidi, ed. — London: Chapman and Hall, 1998. — P. 116–139.
6. Bodwell C. E., Anderson B .A. Nutritional composition and value of meat and meat products // *Muscle as Food* / P. J. Bechtel, ed. — Orlando, FL: Academic Press, Inc., 1986.
7. Faustman C., Chan W. K., Schaefer D. M., Havens A. Beef color update: The role for vitamin E // *J. Anim. Sci.,* 1998, 76, p. 1019–1026.
8. Knight S., Winterfeldt E. A. Nutrient quality and acceptability of mechanically deboned meat // *J. Am. Diet. Assoc.,* 1977, 71, p. 501–504.
9. Bendall J. R. Post-mortem changes in muscle // *The Structure and Function of Muscle* / G. H. Bourne (ed.). — 2nd ed. —Vol. 2, Part 2, Ch. 5. — London: Academic Press, 1973. — P. 243–309.
10. Aberle E. D., Forrest J. C., Gerrard D. E., Mills E. W. *Meat Science.* — Dubuque, IA: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001.
11. Rossi A. E., Dirksen R.T. Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle // *Muscle Nerve,* 2006, 33, p. 715–731.
12. Dulhunty A. F., Haarmann C. S., Green D., Laver D. R., Board P. G., Casarotto M. G. Interaction between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle // *Prog. Biophys. Mol. Biol.,* 2002, 79, p. :45–75.
13. Huxley A. F., Hanson J. Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation // *Nature,* 1954, 173, p. 973–976.
14. Bers D. M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* — Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001.
15. Katz A. M. *Physiology of the Heart.* — Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.
16. Barr L., Christ G. J. *A Functional View of Smooth Muscle.* — Stamford, CT: Jai Press, Inc., 2000.
17. Scopes R. K. Characterization and study of sarcoplasmic proteins // *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food* / E. J. Briskey, R. G. Cassens, B. B. Marsh (eds.). — 2nd ed. — Ch. 22. — Madison, WI: The University of Wisconsin Press, 1970. — P. 471–492.
18. Yates L. D., Greaser M. L. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle // *J. Mol. Biol.,* 1983, 168, p. 123–141.
19. Stefansson G., Hultin H. O. On the solubility of the cod muscle proteins in water // *J. Agric. Food Chem.,* 1994, 42, p. 2656–2664.

20. Bailey A. J., Light N. D. *Connective Tissue in Meat and Meat Products.* — NY: Elsevier Applied Science, 1989.
21. McCormick R. J. Extracellular modifications to muscle collagen: Implication for meat quality // *Poultry Sci.,* 1999, 78, p. 785–791.
22. Asghar A., Pearson A. M. Influence of ante- and postmortem treatments upon muscle composition and meat quality // *Adv. Food Res.,* 1980, 26, p. 53–123.
23. Resurrection A. V. A. Cookery of muscle foods // *Muscle Foods* / D. M. Kinsman, A. W. Kotula, B. C. Breidenstein (eds.). — Ch. 15. — NY: Chapman and Hall, 1994. — P. 406–429.
24. Macintosh B. R., Gardiner P., McComas A. J. *Skeletal Muscle: Form and Function.* — Champaign, IL: Human Kinetics Publishers, 2005.
25. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adoption of tendon and skeletal muscle to mechanical loading // *Physiol. Rev.,* 2004, 84, p. 649–698.
26. Lewis M. P., Machell J. R. A., Hunt N. P., Sinanan A. C. M., Tippett H. L. The extracellular matrix of muscle-implications for the carniofacial musculature // *Eur. J. Oral. Sci.,* 2001, 109, p. 209–221.
27. Osses N., Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.,* 2002, 282, p. C383–C394.
28. Velleman S. G., Liu X., Eggen K. H., Nestor K. E. Developmental regulation of proteoglycan synthesis and decorin expression during turkey embryonic skeletal muscle formation // *Poultry Sci.,* 1999, 78, p. 1619–1626.
29. Velleman S. G. Role of the extracellular matrix in muscle growth and development // *J. Anim. Sci.,* 2001, 80 E.(Suppl. 2), p. E8–E13.
30. Lawson M. A. The role of integrin degradation in post-mortem drip loss in pork // *Meat Sci.,* 2004, 68, p. 559–566.
31. Kucharz E. J. *The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology.* — Berlin: Springer-Verlag, 1992.
32. Greaser M. L. Postmortem changes in muscle extracellular matrix proteins // *Proc. Recip. Meat Con.*, 1997, 50, p. 53–59.
33. Sims T. J., Bailey A. J. Structural aspects of cooked meat // *The Chemistry of Muscle-based Foods* / D. A. Ledward, D. E. Johnston, M. K. Knight (eds.). — Ch. 7. — Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1992. — P. 106–127.
34. Nimni M. E., Harkness R. D. Molecular structures and functions of collagens // *Biochemistry* / M. E. Nimni (ed.). — Vol. 1: Collagens. — Ch. 1. — Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1988. — P. 1–77.
35. Purslow P. P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality // *Meat Sci.,* 2005, 70, p. 435–447.
36. Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H. M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The «phosphocreatine circuit» for cellular energy homeostasis // *Biochem. J.* 1992, 281, p. 21–40.
37. Clark K. A., McElhinny A. S., Beckerle M. C., Gregorio C. C. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function // *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.,* 2002, 18, p. 637–706.
38. Lowey S., Slayter H. S. Weeds A. G. Baker H. Substructure of the myosin molecule I. Subfragments of myosin by enzyme degradation // *J. Mol. Biol.,* 1969, 42, p. 1–6.
39. Stefan H., Kretzschmar K. M., O'Konski C. T., Morales M. F. Flexibility of myosin rod, light meromyosin, and myosin subfragment-2 in solution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1977, 74, p. 4986–4990.
40. Rayment I., Rypniewski W. R., Schmidt-Base K. et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor // *Science,* 1993, 261, p. 50–58.
41. Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes K. C. Atomic structure of the actin: DNase I complex // *Nature,* 1990, 347, p. 37–44.
42. Carlier M. F. Actin: Protein structure and filament dynamics // *J. Biol. Chem.,* 1991, 266, p. 1–4.
43. Brown J. H., Cohen C. Regulation of muscle contraction by tropomyosin and troponin: How structure illuminates function // *Advances in Protein Chemistry* / F. M. Richards, D. S. Eisenberg, J. Kuriyan (eds.). — Vol. 71. — London: Elsevier Academic Press, 2005. — P. 121–159.
44. Lees-Miller J. P., Helfman D. M. The molecular basis for tropomyosin isoform diversity // *Bioessays,* 1991, 13, p. 429–437.
45. Grabarek Z., Tao T., Gergely J. Molecular mechanism of troponin-C function // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 1992, 13, p. 383–393.
46. Potter J. D., Gergely J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase // *J. Biol. Chem.,* 1975, 250, p. 4628–4633.
47. Wang K., McClure J. Tu A. Titin: Major myofibrillar components of striated muscle // *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1979, 76, p. 3698–3702.
48. Labeit S., Kolmerer B. Titins: Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity // *Science,* 1995, 270, p. 293–296.
49. Granzier H. L., Labeit S. The giant protein titin: A major player in myocardial mechanics, signaling, and disease // *Circ. Res.,* 2004, 94, p. 284–295.
50. Tskhovrebova L., Trinick J. Titin: Properties and family relationship // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.,* 2003, 4, p. 679–689.
51. Trinick J. Titin and nebulin: Protein rulers in muscle? // *TIBS,* 1994, 19, p. 405–409.
52. McElhinny A. S., Kazmierski S. T., Labeit S., Gregorio C. C. Nebulin: The nebulous, multifunctional giant of striated muscle // *Trends Cardiovasc Med.,* 2003, 13, p. 195–201.

53. Blanchard A., Ohanian V., Critchley D. The structure and function of alpha-actinin // *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1989, 10, p. 280–289.
54. Maruyama K., Kurokawa H., Oosawa M. et al. β-Actinin is equivalent to Cap Z protein // *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, p. 8712–8715.
55. Lazarides E. Desmin and intermediate filaments in muscle cells // *Results Probl. Cell Differ.*, 1980, 11, p. 124–131.
56. ven der Ven P. F. M., Obermann W. M. J., Lemke B., Gautel M., Weber K., Fuerst D. O. Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of γ-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation // *Cell Mot. Cyto.*, 2000, 45, p. 149–162.
57. Bennett P., Craig R., Starr R., Offer G. The ultrastructural location of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1986m 7, p. 550–567.
58. Koretz J. F., Irving T. C., Wang K. Filamentous aggregates of native titin and binding of C-protein and AMP-deaminase // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 304, p. 305–309.
59. Leong P., MacLennan D. H. Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins // *Biochem. Cell Biol.*, 1998, 76, p. 681–694.
60. Catterall W. A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels // *Science*, 1988, 242, p. 50–61.
61. Sutko J. L., Airey J. A. Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: Does diversity in form equal diversity in function? // *Physiol. Rev.*, 1996, 76, p. 1027–1071.
62. Block B. A., Imagawa T., Campbell K. P., Franzini-Armsrong C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle // *J. Cell Biol.*, 1988, 107, p. 2587–2600.
63. Felder E., Franzini-Armstrong C. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, p. 1695–1700.
64. MacLennan D. H., Rice W. J., Green N. M. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases // *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, p. 28815–28818.
65. Rayment I., Holden H. M. The three-dimensional structure of a molecular motor // *TIBS*, 1994, 19, p. 129–135.
66. Onishi H., Mochizuki N., Morales M. F. On the myosin catalysis of ATP hydrolysis // *Biochemistry*, 2004, 43, p. 3757–3763.
67. Pette D., Staron R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles // *Histochem. Cell Biol.*, 2001, 115, p. 359–372.
68. Spangenburg E. E., Booth F. W. Molecular regulation of individual skeletal muscle fiber types // *Acta Physiol. Scand.*, 2003, 178, p. 413–424.
69. Stevens S. W., Binder-Macleod S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications // *Phys. Ther.*, 2001, 81, p. 1810–1816.
70. Pette D., Peuker H., Staron R. S. The impact of biochemical methods for single muscle fiber analysis // *Acta Physiol. Scand.*, 1999, 166, p. 261–277.
71. Malkin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M. Determinants of meat quality: Tenderness // *Proc. Nutri. Soc.*, 2003, 62, p. 337–347.
72. Huff-Lonergan E., Mitsuhashi T., Beekman D. D., Parrish E. C., Olson D. G., Robson R. M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle // *J. Anim. Sci.*, 1996, 74, p. 993–1008.
73. Goll D. E., Thompson V. F., Li H. Wei W., Cong J. The calpain system // *Physiol. Rev.*, 2002, 83, p. 731–801.
74. Bartoli M., Richard I. Calpains in muscle wasting. The Intern // *J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, 37, p. 2115–2133.
75. Sorimachi H., Kinbara K., Kimura S. et al. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associated with connectin through IS2, a p94-specific sequence // *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, p. 31158–31162.
76. Koohmaraie M. Role of neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness // *Proc. Recip. Meat Conf.*, 1992, 45, p. 63–71.
77. Zeece M. G., Woods T. L., Keen M. A., Reville W. J. Role of proteinases and inhibitors in postmortem muscle protein degradation // *Proc. Recip. Meat Conf.*, 1992, 45, p. 51–61.
78. Solomon V., Goldberg A. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts // *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, p. 26690–26697.
79. Kent M. P., Spencer M. J., Koohmaraie M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin // *J. Anim. Sci.*, 2004, 82, p. 794–801.
80. Wismer-Pedersen J. Quality of pork in relation of rate of pH change postmortem // *Food Res.*, 1959, 24, p. 711–727.
81. Mitchell G., Heffron J. J. A. Porcine stress syndromes // *Adv. Food Res.*, 1982, 28, p. 267–230.
82. Fujii J., Ostu K., Zorzato F. et al. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia // *Science*, 1991, 253, p. 448–451.
83. Sosnicki A. A., Greaser M. L., Pietrzak M., Pospiech E., Sante V. PSE-like syndrome in breast muscle of domestic turkeys: A review // *J. Muscle Foods*, 1998, 9, p. 13–23.
84. Chiang W., Allison C., Linz J., Strasburg G. Identification of two αRYR alleles and characterization of αRYR transcript variants in turkey skeletal muscle // *Gene*, 2004, 30. p. 177–184.
85. Andersson L. Identification and characterization of AMPK gamma 3 mutations in the pig // *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31, p. 232–235.

86. Pearson A. M., Young R. B. *Muscle and Meat Biochemistry.* — San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1989.
87. Marsh B. B., Thompson J. F. Rigor mortis and thaw rigor in lamb // *J. Sci. Food Agr.,* 1958, 9, p. 419–424.
88. Marsh B. B., Leet N. G. Resistance to shearing of heat-denatured muscle in relation to shortening // *Nature,* 1966, 211, p. 635–636.
89. Marsh B. B. Electrical-stimulation research: Present concepts and future directions // *Adv. Meat Res.,* 1985, 1, p. 277–305.
90. Carse W. A. Meat quality and the acceleration of postmortem glycolysis by electrical stimulation // *J. Food Technol.,* 1973, 8, p. 163–166.
91. Sharp, J.G. and B.B. Marsh (1953). Whale meat, production and preservation. G.B., Dep. Sci. Ind. Res., Food Invest. Board, Spec. Rep. 58.
92. Smith G. C. Effects of electrical stimulation on meat quality, color, grade, heat ring and palatability // *Adv. Meat Res.* 1985, 1, p. 121–158.
93. Pearson A. M., Dutson T. R. Scientific basis for electrical stimulation // *Adv. Meat Res.,* 1985, 1, p. 185–218.
94. Sorinmade S. O., Cross H. R., Ono K., Wergin W. P. Mechanisms of ultrastructural changes in electrically stimulated beef longissimus muscle // *Meat Sci.* 1982, 6, p. 71–77.
95. Fennema O. Behavior of proteins at low temperatures // *Food Protein Deterioration Mechanisms and Functionality* / J. P. Cherry, ed. — ACS Symposium Series 206. — Washington, DC: American Chemical Society, 1982. — P. 109–133.
96. Fernandez-Martin E., Otero L., Solas M. T., Sanz P. D. Protein denaturation and structural damage during high-pressure-shift freezing of porcine and bovine muscle // *J.. Food Sci.,* 2000, 65, p. 1002–1008.
97. Zhu S., Le Bail A., Ramaswamy H. S., Chapleau N. Characterization of ice crystals in pork muscle formed by pressure-shift freezing as compared with classical freezing methods // *J. Food Sci.,* 2004, 69, p. 190–197.
98. Cheftel J. C., Culioli J. Effects of high pressure on meat: A review // *Meat Sci.,* 1997, 46, p. 211–236.
99. Heremans K., Van Camp J., Huyghebaert A. High-pressure effects on proteins // *Food Proteins and Their Applications* / S. Damoradan, A. Paraf (eds). — NY: Marcel Dekker, Inc., 1997. — P. 473–502.
100. Yamamoto K., Hayashi S., Yasui T. Hydrostatic pressure-induced aggregation of myosin molecules in 0,5 M KCl at pH 6,0 // *High Pressure and Biotechnology* / C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, O. Masson (eds). — Montrouge: John Libbey Eurotext, Ltd, 1992. — P. 229–233.
101. Jung S., Ghoul M., de Lamballerie-Anton M. Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing // *Meat Sci.,* 2000, 56, p. 239–246.
102. Ouali A. Meat tenderization: Possible causes and mechanisms: A review // *J. Muscle Foods,* 1990, 1, p. 129–165.
103. Solomon M. B., Long J. B., Eastridge J. S. The hydrodyne: Anew process to improve beef tenderness // *J Anim. Sci.,* 1997, 75, p. 1534–1537.
104. Ahn D. U., Jo C., Du M., Olson D.G., Nam K. C. Quality characteristics of pork patties irradiated and stored in different packaging and storage conditions // *Meat Sci.,* 2000, 56, p. 203–209.
105. Brewer S. Irradiation effects on meat color — A review // *Meat Sci.,* 2004, 68, p. 1–17.
106. Nam K. C., Min B. R., Park K. S., Lee S. C., Ahn D. U. Effects of ascorbic acid and antioxidants on the lipid oxidation and volatiles of irradiated ground beef // *J. Food Sci.,* 2003, 68, p. 1680–1685.
107. Offer G., Trinick J. On the mechanism of water holding in meat: The swelling and shrinking of myofibrils // *Meat Sci.,* 1983, 8, p. 245–281.
108. Hamm R. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements // *Muscle as Food* / P. J. Bechtel (ed.). — San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1986. — P. 135–199.
109. Xiong Y. L., Lou X., Harmon R. J., Wang C., Moody W. G. Salt- andpyrophosphate-induced structural changes in myofibrils from chicken red and white muscle // *J. Sci. Food Agric.,* 1999, 80, p. 1176–1182.
110. Parsons N., Knight P. Origin of variable extraction of myosin from myofibrils treated with salt and pyrophosphate // *J. Sci. Food Agric.,* 1990, 51, p. 71–90.
111. Xiong Y. L., Lou X., Wang C., Moody W. G., Harmon R. J. Protein extraction from chicken myofibrils irrigated with various polyphosphate and NaCl solutions // *J. Food Sci.,* 2000, 65, p. 96–100.
112. Xiong Y. L. Muscle proteins // *Proteins in Food Processing* / R. Yada (ed.). — Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2004. — P. 100–122.
113. Asghar A., Samejima K., Yasui T. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 1985, 22, p. 27–106.
114. Samejima K., Hashimoto Y., Yasui T., Fukazawa T. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin and myosin-subunits in a saline model system // *J. Food Sci.,* 1969, 34, p. 242–245.
115. Morita J.-I., Ogata T. Role of light chains in heat-induced gelation of skeletal muscle myosin // *J. Food Sci.,* 1991, 56, p. 855–856.
116. Xiong Y. L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 1994, 34, p. 293–319.
117. Kuraishi C., Sakamoto J., Yamazaki K., Susa Y., Kuhara C., Soeda T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking // *J. Food Sci.,* 1997, 62, p. 488–490.

118. Ramirez-Suarez J. C., Xiong Y. L. Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures // *Meat Sci.*, 2003, 65, p. 899–907.
119. Galluzzo S. J., Regenstein J. M. Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: Myosin, actin and synthetic actomyosin // *J. Food Sci.*, 1978, 43, p. 1761–1765.
120. Gordon A., Barbut S. Mechanism of meat batter stabilization: A review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1992, 32, p. 299–332.
121. Ramirez-Suarez J. C., Xiong Y. L. Rheological properties of mixed muscle/nonmuscle protein emulsions treated with transglutaminase at two ionic strengths // *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2003, 38, p. 777–785.
122. Motoki M., Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing // *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9, p. 204–210.
123. An H., Seymour T. A. Wu J., Morrissey M. T. Assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merlucciu productus*) protease // *J. Food Sci.* 1994, 59, p. 277–281.
124. Tzeng S. S., Jiang S. T. Glycosylation modification improved the characteristics of recombinant chicken cystatin and its application on mackerel surimi // *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p. 3612–3616.
125. Hultin H. O., Kelleher S. D. Surimi processing from dark muscle fish // *Surimi and Surimi Seafood* / J. W. Park (ed.). — NY: Marcel Dekker, Inc., 2000. — P. 59–77.
126. Foegeding E. A., Lanier T. C., Hultin H. O. Characteristics of edible muscle tissues // *Food Chemistry* / O. R. Fennema, ed. — 3rd ed. — NY: Marcel Dekker, Inc., 1996.
127. Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and floride / Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. — 1997.
128. Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B_6, folate, vitamin B_{12}, pantothenic acid, biotin, and choline/ Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. — 1998.
129. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc/ Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. — 2000.
130. Dietary Reference Intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate/ Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. — 2004.
131. Tortora G. J., Derrickson B. *Principles of Anatomy and Physiology.* — Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc., 2006.
132. Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O. *Basic Histology.* — Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1989.
133. Chiang W., Strasburg G. M., Byrem T.M. Red meats // *Food Chemistry: Principles and Applications* / Y. H. Hui (ed.). — 2nd ed. — West Sacramento, CA: Science Technology System, 2007.
134. Craig R., Woodhead J. L. Structure and function of myosin filaments // *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006, 16, p. 204–212.
135. Rayment L., Smith C., Yount R. G. The Active Site of Myosin // *Annu.Rev. Physiol.*, 1996, 58, p. 671–702.
136. Locker R. H., Hagyard C. J. A cold-shortening effect in beef muscle // *J. Sci. Food Agric.*, 1963, 14, p. 787–793.

17. ФИЗИОЛОГИЯ СЪЕДОБНЫХ ЧАСТЕЙ РАСТЕНИЯ ПОСЛЕ СБОРА УРОЖАЯ

Джеффри К. Брехт (*Jeffrey K. Brecht*), Марк А. Райтенур (*Mark A. Ritenour*),
Норман Ф. Хаард (*Norman F. Haard*), Грейди У. Чизм (*Grady W. Chism*)
Перевод Д. К Рапопорта под науч. ред. д-ра фарм. наук, проф. Т. Л. Киселевой

Содержание

17.1. Введение. . 898
17.1.1. Возможные потери урожая ... 898
17.2. Физиология растений после сбора урожая 901
17.2.1. Морфология, структура, рост и развитие растений 901
17.2.1.1. Органы растений 901
17.2.1.2. Клеточная структура .. 905
17.2.1.3. Рост и развитие отдельных частей растительной клетки. . .. 907
17.2.1.4. Различия в потребительской зрелости в зависимости от физиологического развития растений 908
17.2.2. Дыхание растений . .. 908
17.2.2.1. Респирационные факторы . 910
17.2.2.2. Снижение дыхательной активности и увеличение срока хранения . 911
17.2.3. Экспрессия генов и синтез белка ... 912
17.2.3.1. Технология рекомбинантных ДНК и генная инженерия растительного сырья . 913
17.2.4. Растительные гормоны 913
17.2.4.1. Роль растительных гормонов в развитии растений .. 913
17.2.4.2. Этилен .. 914
17.2.5. Выделение и потеря влаги . 918
17.2.6. Реакция растений на стресс 919
17.2.6.1. Физические повреждения..... 920
17.2.6.2. Температурные экстремумы..... .. 921
17.2.6.3. Действие ионизирующего излучения 924
17.3. Химический состав растительных тканей . 925
17.3.1. Основные вещества съедобных растительных тканей... 927
17.3.1.1. Вода... . 927
17.3.1.2. Углеводы 927
17.3.1.3. Белки и другие азотсодержащие соединения . 931
17.3.1.4. Жиры и жиросодержащие соединения. 932
17.3.1.5. Органические кислоты 935
17.3.1.6. Фенольные кислоты 936
17.3.1.7. Красящие вещества 940
17.3.1.8. Витамины . 940
17.3.1.9. Минеральные вещества. 941
17.3.2. Изменения, влияющие на качество продуктов растительного происхождения 942
17.3.2.1. Изменения компонентов клеточной стенки 942
17.3.2.2. Осахаривание крахмала..... 943
17.3.2.3. Метаболизм органических кислот. ... 946
17.3.2.4. Метаболизм жиров..... 946

17.3.2.5. Метаболизм красящих веществ 948
17.3.2.6. Биогенез и распад ароматических соединений. 950
17.4. Обеспечение качества и увеличение срока хранения растительного сырья. 951
17.4.1. Степень зрелости и стандарты качества. . . 951
17.4.2. Температурные режимы 953
17.4.3. Способы охлаждения 953
17.4.3.1. Воздушное охлаждение 953
17.4.3.2. Охлаждение водой (гидроохлаждение). 954
17.4.3.3. Охлаждение льдом 955
17.4.3.4. Вакуумное охлаждение 955
17.4.4. Транспортировка и хранение. Хранение в регулируемой и модифицированной газовой среде. 957
17.4.4.1. Относительная влажность 957
17.4.4.2. Транспортировка 957
17.4.4.3. Хранение в регулируемой или модифицированной газовой среде 957
17.4.4.4. Преимущества РГС- и МГС-хранения. 958
17.4.4.5. Дефекты, обусловленные РГС-хранением. 958
17.5. Некоторые свойства растительного сырья. 959
17.5.1. Зерно, бобовые и семена масличных культур 959
17.5.2. Вегетативные, цветковые и запасающие органы растений 959
17.5.3. Созревшие и несозревшие плоды овощных культур 960
17.5.4. Ягоды, семечковые и косточковые фрукты. 961
17.5.5. Субтропические фрукты. . . . 961
17.5.6. Тропические фрукты 962
17.5.7. Свеженарезанные овощи и фрукты 962
17.6. Влияние на овощи и фрукты процессов их переработки. 963
17.6.1. Химические изменения 963
17.6.2. Ферментативные реакции 964
17.6.3. Разрушение клеток 964
17.6.4. Изменения структуры молекул 964
17.6.5. Прочие факторы изменения скорости реакций . 966
17.7. Краткое резюме. . . 966
Дополнительная литература . 966
Литература 967

17.1. Введение

17.1.1. Возможные потери урожая

Благодаря фотосинтезу растения издавна являются источником пищи для человека. Более чем 300 000 таксономически различимых растений ежегодно связывают примерно 150 млрд углерода. Растительная пища обеспечивает около 70% потребляемого населением Земли белка. В развитых странах типа США около 30% пищевого белка поступает непосредственно из растений. Зерна злаков обеспечивают 10 000–15 000 кДж/кг, то есть в 10–20 раз больше энергии на единицу массы, чем самые питательные овощи и фрукты. По некоторым оценкам они обеспечивают 50% потребляемых населением Земли калорий и 70–80% калорий, потребляемых населением Китая и Индии. Сельскохозяйственные культуры являются важнейшим источником не только белка, но и других нутриентов, причем некоторые культуры имеют относительно высокий «индекс нутритивного качества» (*INQ*), рассчитываемый как отношение обеспеченной потребности в нутриентах (в процентах) к обеспеченной потребности в калориях (тоже в процентах)

[60]; сумма значений *INQ* по семи основным нутриентам у шпината, капусты-брокколи и салат-латука примерно в 10 раз выше, чем у цельного молока, яиц или мяса (табл. 17.1).

Продукты растениеводства являются важными источниками не только разнообразных нутриентов (например, витаминов и минеральных веществ), но и других важнейших компонентов здорового питания, не относящихся к нутриентам (например, антиоксидантов). Как правило, продукты растениеводства характеризуются меньшей калорийной плотностью (энергетической ценностью) по сравнению с продуктами животного происхождения, поэтому их *INQ* обычно очень высок.

Несмотря на то, что в эту «нутритивную картину» хорошо вписываются тысячи продуктов растительного происхождения, особое значение в мировой торговле имеют всего 100–200 видов растений (табл. 17.2). К основным культивируемым по всему миру растениям относят сахарный тростник, пшеницу, кукурузу, рис, картофель, сахарную свеклу, ячмень, кассаву (маниоку), батат (сладкий картофель) и сою. Эти культуры прямо или косвенно обеспечивают около 80% потребляемой человеком энергии и белка.

В современном растениеводстве основной задачей является обеспечения потребителей высококачественной продукцией, которую им захочется купить. В хранение выращенной продукции и в сельское хозяйство в целом вкладываются огромные средства (в том числе в выращивание и сбор урожая, упаковку, транспортировку, сбыт и т. п.), однако из-за повреждений и порчи во время и после сбора урожая, а также при отсутствии спроса, растительное сырье гниет и идет в отходы. В мировом масштабе порча собранного урожая составляет около 40% всех потерь потенциальных пищевых продуктов [64]. Потери после сбора урожая могут быть обусловлены плохими погодными условиями (температурой, относительной влажностью, составом газовой среды, воздействием света и т. п.), патогенными микроорганизмами (грибами, бактериями, вирусами и т. п.), физическими повреждениями, грызунами и птицами, физиологическими расстройствами, а также контаминацией посторонними примесями.

Собранный урожай подразделяется на две крупные категории — зерновые и масличные культуры, и скоропортящиеся фрукты и овощи. Урожай зерновых и масличных культур обычно составляют «спящие» части растений с низким содержанием влаги (10–20%) и небольшого размера, с низкой дыхательной активностью и небольшим выделением теплоты, твердые по текстуре, со сроком хранения больше года. Послеуборочные потери этих культур обычно бывают обусловлены внешними причинами типа воздействия плесеней, насекомых и грызунов. Скоропортящиеся культуры — это обычно метаболически активные части растений с более высоким содержанием влаги (70–95%), они крупнее по размеру, мягче по текстуре; у них выше дыхательная активность и выделение теплоты, а срок их хранения составляет от нескольких суток до нескольких месяцев. Послеуборочные потери этих видов сельхозпродукции обычно бывают обусловлены действием внутренних факторов типа гнили, физических повреждений и увядания.

Таблица 17.1

Значения индекса нутритивного качества (*INQ*) по семи основным нутриентам для некоторых пищевых продуктов растительного и животного происхождения. По [60, с. 521]

Пищевой продукт	*INQ* > 1, количество нутриентов	Общий показатель *INQ* (7 нутриентов)
Шпинат	7	185
Капуста-брокколи	7	180
Салат-латук	7	148
Апельсины	7	63
Абрикосы	7	45
Яблоки	2	8
Фасоль, темно-синяя	5	14
Картофель	4	16
Хлеб из грубой пшеничной муки	5	8
Молоко цельное	4	17
Говяжий фарш	4	13
Яйца куриные	4	16
Тунец	3	17

Таблица 17.2
Некоторые семейства Царства растений, являющиеся важным источником пищи для человека

Семейство	Некоторые представители	Свойства
Злаковые (*Gramineae*)	Злаковые культуры, сахарный тростник, бамбук	Прямо или косвенно обеспечивают около 75% пищевого белка и энергии (энергетическая плотность 10 000–15 000 кДж/кг)
Бобовые (*Leguminosae*)	Зеленый горошек, фасоль, бобы, соевые бобы, чечевица, арахис	Содержат примерно в два раза больше белка, чем зерновые. В США наибольший объем сбора дают соевые бобы
Пальмовые (*Palmaceae*)	Кокосовый орех, финики, пальма	Источник растительных масел
Розоцветные (*Rosaceae*)	Многие фрукты и ягоды, в том числе яблоки, груши, персики, абрикосы, сливы, вишня, малина, клубника, лепестки роз	Фрукты бывают с косточками и без косточек. Семечковые, косточковые и сборные плоды в ходе созревания дают характерный сладкий вкус и аромат
Тыквенные (*Curcurbitaceae*)	Дыни, сквош, арбузы, огурцы, тыквы	История культивирования этих растений насчитывает более 9000 лет; по мере созревания многих эти плоды не становятся сладкими
Капустные (*Brassicaceae*)	Кочанная и цветная капуста, редька, турнепс, рапс (канола), хрен, горчица	Характеризуются содержанием резко пахнущих серосодержащих соединений или «горчичных масел», образующихся ферментативным путем из тиоглюкозидов
Яснотковые (*Lamiaceae*)	Перечная мята, базилик, майоран, орегано, розмарин, тимьян, шалфей, чабер	Травянистые растения, большинство которых произрастают в Средиземноморье; в «волоскоподобных» железах листьев и стеблей содержатся ароматические масла
Сельдерейные (*Apiaceae*)	Морковь, сельдерей, петрушка, тмин, укроп, фенхель, кориандр, анис, кумин	Травы и пряности; богаты ароматическими маслами
Пасленовые (*Solanaceae*)	Картофель, томаты, баклажаны, перец	Для некоторых несъедобных растений этого семейства характерно содержание токсичных стероидных алкалоидов
Лилейные (*Liliaceae*)	Лук репчатый и лук-шалот, чеснок, шнитт-лук, лук-порей, спаржа	Для всех видов лука характерно высокое содержание ароматических слезоточивых серосодержащих соединений, ферментативно образующихся из сульфоксидов S-алкилцистеина
Астровые (*Asteraceae*)	Эндивий, салат-латук, одуванчик, цикорий	В соке астровых содержатся тритерпеноидные спирты, действующие как снотворное
Рутовые (*Rutaceae*)	Цитрусовые — лимоны, апельсины, грейпфруты, лайм, сладкий лимон, кумкват, мандарины	Характерный вкус и аромат обеспечивается флавоноидными гликозидами и терпенами

Существуют разные способы переработки сельхозпродукции. Различные виды сельскохозяйственного сырья консервируют, замораживают, маринуют, сушат или измельчают в целях сохранения их нутритивных свойств. Все эти способы помогают сохранить пищевую ценность и вкус продуктов из растительного сырья, однако это сырье уже больше нельзя считать «живым». Вместе с тем существует большой спрос на свежую сельскохозяйственную продукцию с ее уникальными характеристиками. Для обеспечения этих свойств очень важно поддерживать сельхозпродукцию в «живом» состоянии, понимая, что собранные продукты по-прежнему «дышат», что в них происходят различные физиологические процессы с сопутствующими им морфологическими изменениями, выражающимися в изменении состава нутриентов и цвета.

В этой главе мы коротко рассмотрим важнейшие принципы физиологии растений после сбора урожая, состав растительного сырья и способы его переработки, необходимые для успешного сохранения и поставки продуктов из растительного сырья на целевые рынки.

17.2. Физиология растений после сбора урожая

17.2.1. Морфология, структура, рост и развитие растений

Огромное разнообразие заготовляемых частей растений и их структур представлено овощами и фруктами, зернами и семенами (табл. 17.3). Для пищевых химиков знание структуры съедобных частей растений очень важно по целому ряду причин. Следует понимать, что подавляющая часть собранной массы неоднородна по типам клеток, клеточной организации и распределению химических веществ. Кроме того, природа и степень химических изменений в тканях после сбора урожая частично, если не полностью, зависят от клеточной организации. Каждая ткань структурно приспособлена для выполнения определенной функции. Большая часть метаболической активности растения выполняется неспециализированной тканью, называемой паренхимой, которая обычно составляет основной объем съедобной части растений. Внешний слой растения называется эпидермисом, который структурно приспособлен для защиты растения от биологического и физического стресса. На поверхности эпидермиса в ходе развития растения могут накапливаться смолы, образуя более или менее водонепроницаемый слой, например как у зрелых плодов. Структурную целостность обеспечивают специализированные ткани, называемые колленхимой и склеренхимой. Вода, минеральные вещества и молекулы растворенных веществ переносятся сосудистыми тканями — ксилемой и флоэмой.

Таблица 17.3
Классификация съедобных растений по органам, составляющим съедобную часть

Часть растения	Примеры
Растение в целом	Свекла, редька
Побег	Зеленый лук
Корень:	
первичный	Морковь, репа
вторичный	Батат, кассава
Стебель	Спаржа, кольраби
Клубни	Картофель, ямс
Листья:	
преимущественно листовые пластинки	Листья салата-латука, шпинат
преимущественно черешки	Сельдерей, ревень
почечные	Капуста кочанная, салат кочанный
Цветковые части растения	Артишок, брокколи, цветная капуста
Луковица	Лук репчатый, чеснок
Плоды:	
не мясистые (не сочные), незрелые	Зеленый горошек свежий, зеленостручковая фасоль, окра, сладкая кукуруза
не мясистые (сухие), зрелые	Семена и орехи
мясистые (сочные), незрелые	Огурцы, тыква обыкновенная
мясистые (сочные), зрелые	Яблоки, груши, персики, ягоды, виноград, цитрусовые, тропические фрукты, дыни, томаты, тыква крупноплодная

17.2.1.1. Органы растений

С точки зрения переработки сельскохозяйственного сырья после сбора урожая полезно классифицировать растительные ткани в зависимости от органа или органов, составляющих съедобную часть растений (табл. 17.4). Это связано с тем, что в большинстве случаев ткани, входящие в одну группу и собранные приблизительно в одну и ту же фазу развития, обладают аналогичными послеуборочными свойствами и требованиями к переработке.

Таблица 17.4
Взаимосвязь между общей структурой сельхозсырья и его поведением после сбора урожая

Группа	Общие послеуборочные характеристики
Быстро развивающиеся вегетативные структуры незрелых плодов	Скоропортящиеся
	Как правило, характеризуются высокой дыхательной активностью
	Подвержены быстрым химическим изменениям
	Основной причиной порчи является потеря массы
	Продолжающийся рост и развитие могут привести к проблемам
Зрелые плоды	Скорость порчи может различаться — от очень высокой (клубника) до низкой (яблоки)
	При созревании характеризуются многочисленными физиологическими и химическими изменениями в составе
	Важным фактором порчи является увядание
Мякоть и побеги	Характеризуются низкой скоростью порчи
	и низкой дыхательной активностью
	Порча при росте усиливается и ускоряется
Созревшие зерна, семена и орехи	Характеризуются очень длительными сроками хранения
	и очень низкой дыхательной активностью
	Для соблюдения срока хранения важно оптимальное содержание влаги
	Одним из факторов порчи может являться прорастание

17.2.1.1.1. Листья и черешки

Лист — это обычно плоский вытянутый орган растения, предназначенный главным образом для фотосинтеза, однако у листьев могут встречаться вариации и в морфологии, и в функциональности. Лист состоит из эпидермальной ткани, покрытой обычно тонкой воскоподобной кутикулой и содержащей специальные поры для газообмена, которые называют устьицами. Под этим эпидермальным слоем расположены удлиненные, тесно упакованные клетки с высоким содержанием хлоропластов, за которыми следуют паренхимные клети разных размеров с большим межклеточным пространством. Система сосудов состоит из сетевых жилок у двудольных растений (сетчатое жилкование) и параллельных жилок (линейное жилкование) у однодольных. Черешки листа выполняют функцию удерживания листьев на растении и транспортируют от листа в другие части растения продукты фотосинтеза, а в обратном направлении — воду и нутриенты. Листья являются метаболически активными органами с очень небольшими запасами энергии, что приводит к их быстрой порче при отделении от растения. Примером могут служить листья салата-латука, салатной горчицы, листовой свеклы, шпината, кресса водяного, петрушки и капусты.

17.2.1.1.2. Цветки

Цветки представляют собой репродуктивные органы, которые в незрелом состоянии употребляют в пищу как овощи (например, цветки капусты-брокколи или цветной капусты). В цветках имеются женские органы (пестики) и мужские (тычинки), окруженные чашечкой цветка, состоящей из лепестков и чашелистиков. Незрелые ткани цветка из-за небольшого содержания на их поверхности воскообразных веществ легко теряют влагу и относятся к наиболее метаболически активным тканям растений, что делает их особенно скоропортящимися.

17.2.1.1.3. Плоды

В ботанике плодом называют созревшую завязь или завязь с прилегающими к ней частями, то есть семясодержащий орган. Мякоть мясистых (сочных) плодов может развиваться из ложа соцветия, карпелярной ткани, или из внешних по отношению к цветку структур (например, из прицветников). Независимо от своего происхождения плоды состоят преимущественно из паренхимной ткани примерно с 20% межкле-

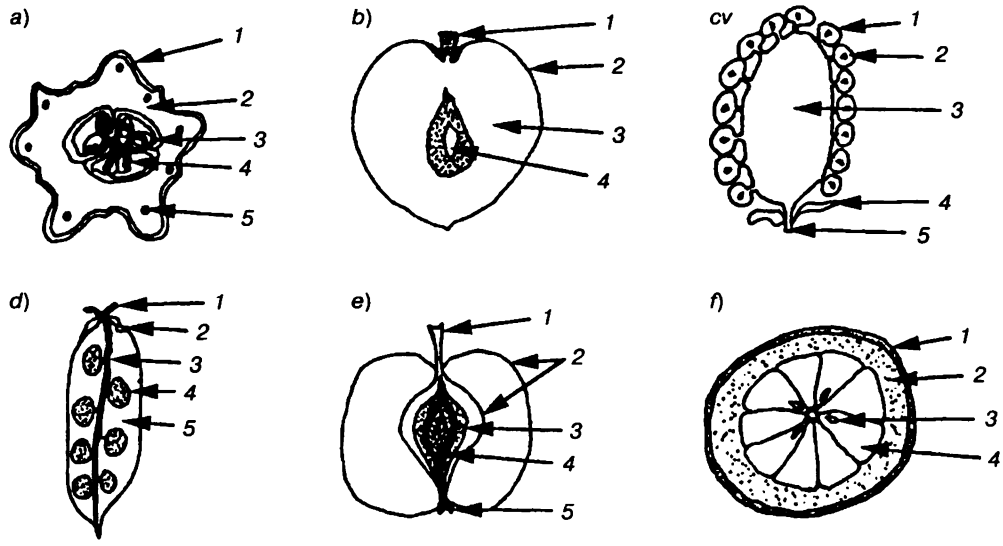


Рис. 17.1. Схематическое представление структуры различных типов плодов: *a* —тыквенные (огурец, тыква большая столовая, тыква обыкновенная) в поперечном разрезе: *1* — кожура (корка), *2* — мякоть (стенка завязи), *3* — семяложе, *4* — семена, *5* — пучок сосудов; *b* — костянка (вишня, персик и слива) в продольном разрезе: *1* — плодоножка, *2* — кожица, *3* — мякоть (стенка завязи) с косточкой, *4*— семечко; *c* — соплодие (малина, земляника и ежевика) в продольном сечении: *1* — мясистая стенка завязи, *2* — семечко (костянковая стенка завязи с семечкой), *3* — мясистое цветоложе (рецептакула), *4* — чашелистик, *5* — плодоножка; *d* — боб (горох, соевые бобы, лимская фасоль) в продольном разрезе: *1* — плодоножка, 2— чашелистик, *3* — пучки сосудов, *4* — семя, *5* — стручок (стенка завязи); *e* — яблоко (плод семечковых; яблоко и груша) в продольном сечении: *1* — плодоножка, *2* — кожица и мякоть (цветоложе), *3* — кожистый плодолистик (стенка завязи), *4* — семя и чашечка цветка (пестики и тычинки); *f* — плод цитрусовых в поперечном сечении: *1* — коленхимный экзокарпий (флаведо, наружный слой околоплодника), *2* — паренхимный мезокарпий (альбедо), *3* — семя, *4* — эндокарпий соковых мешочков, образованный расщеплением групп паренхимоподобных клеток

точного пространства. Структурные признаки некоторых плодов приведены на рис. 17.1. Зерна представляют собой тип плода, называемый зерновкой, — в нем тонкая плодовая оболочка твердо скреплена с семенной (рис. 17.2). Основной съедобной частью семян и орехов является эндосперм, функция которого заключается в накоплении энергетических запасов для развивающегося семени.

Эндосперм бобовых семян абсорбирован зародышем, который в семядоле превращает нутриенты в первично съедобную форму. Способность плодов к порче широко варьирует: у мясистых плодов она зависит преимущественно от степени зрелости в момент сбора урожая (спелые плоды наиболее скоропортящиеся), а немясистые плоды быстрее всего портятся, когда в них развиваются семена (например, зеленый горошек и сладкая кукуруза) и меньше портятся в сухом состоянии (например, зерновые и орехи).

17.2.7.7.4. Стебли

Стебель состоит из четырех типов тканей (снаружи внутрь): эпидермиса, коры, системы сосудов и паренхимы (сердцевины), образующей центральное ядро (рис. 17.3, *a*). Эти вторичные ткани могут быть разной формы (рис. 17.3, *b* и *c*). Большинство съедобных стеблей представляют собой не надземные поддерживающие органы, а несколько измененные подземные морфологические структуры (клубнелуковицы, клубни и корневища, такие как у картофеля и имбиря), или луковицы (укороченные стебли, покрытые слоями мясистых листьев, как у репчатого лука и чеснока). Эти модифицированные стебли выполняют функцию хранилища энергии, запасаемой в период покоя в виде углеводов для роста растения. Скорость обмена веществ в этих органах невелика, и хранить их можно довольно долго (несколько месяцев). Примером съедобного надземного стебля может служить спаржа, которую, в отличие от вышеописанных органов, собирают в виде быстро растущего стебля, очень метаболически активного и, следовательно, скоропортящегося.

17.2.1.1.5. Корни

Анатомическое строение корней представлено на рис. 17.4. Толстые корни образуются путем вторичного роста камбия (рис. 17.4, *b* и c). Эти вторичные сосудистые ткани корней состоят из небольших групп про-

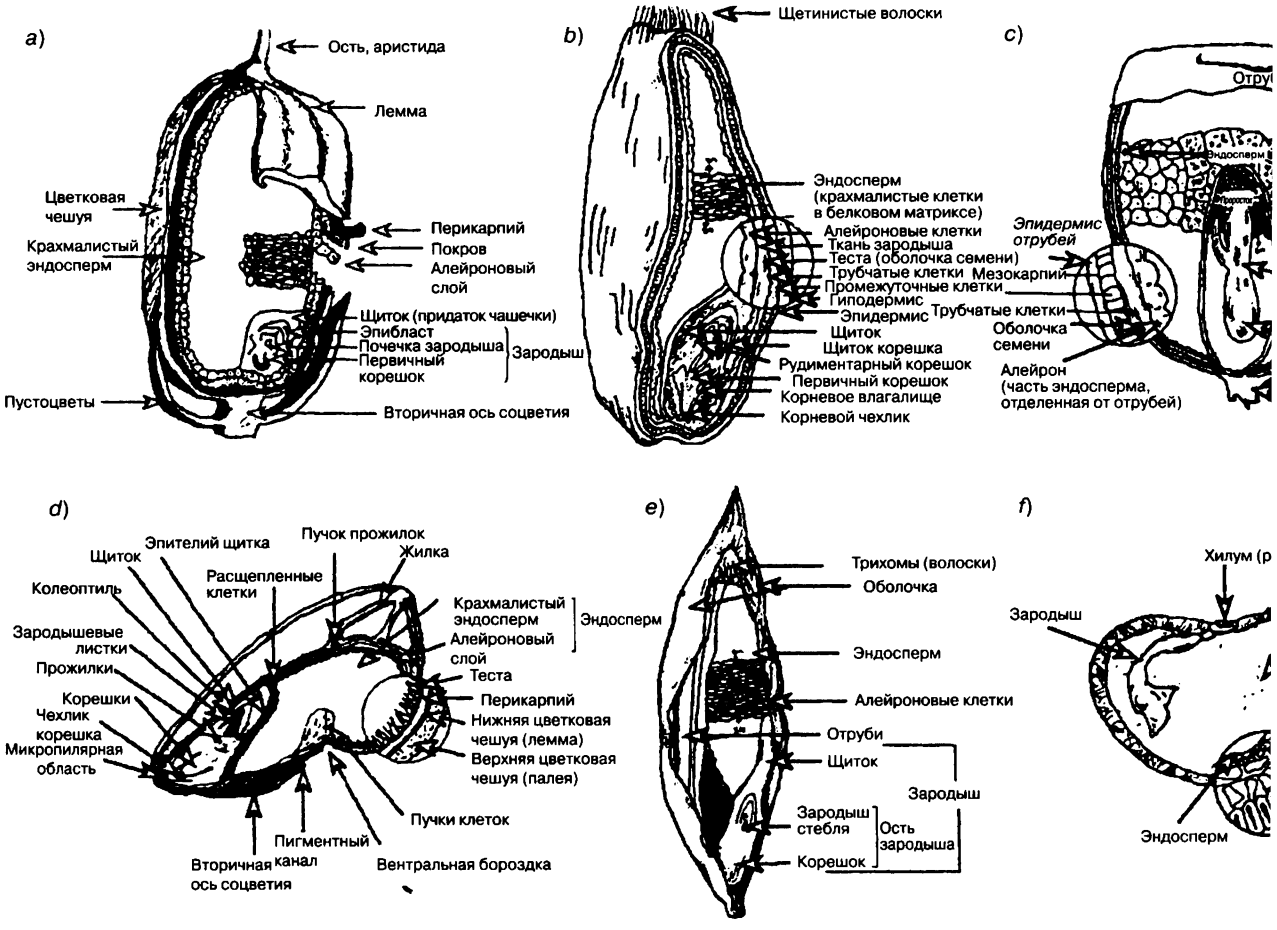


Рис. 17.2. Схематическое представление строения зерновки: *a* — риса; *b* — пшеницы; *c* — кукурузы; *d* — ячменя; *e* — овса плодовой оболочки (соевого боба). См. также рис. 17.1, *d*, поз. 4

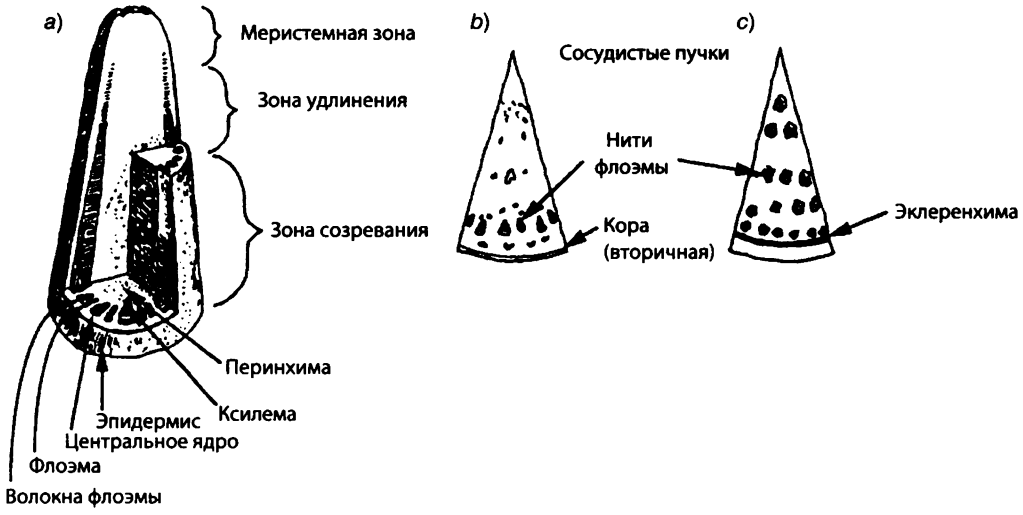


Рис. 17.3. *a* —схематичное изображение строения стебля; *b* — у стеблей двудольных растений (например, картофеля) сосудистые пучки образуют одинарное кольцо (представлено в поперечном разрезе); с — у однодольных (например, у спаржи) заметно характерное проникновение сосудистых пучков во всю паренхимную ткань

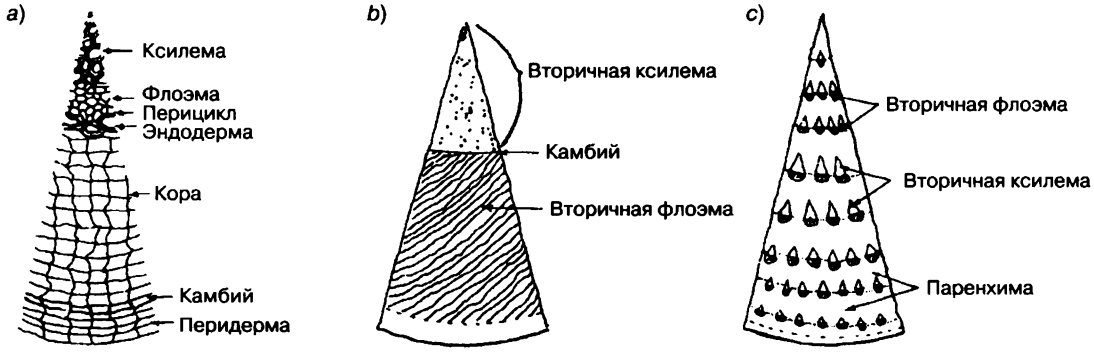


Рис. 17.4. a — схематичное изображение анатомической структуры корня (в поперечном сечении). Толстые корни образуются в ходе вторичного роста меристемной ткани, называемой камбием; b — типичным примером может служить морковь, у которой камбий с внешней стороны образует флоэму, а изнутри — ксилему. Проводящие элементы рассредоточены по всей толще паренхимной ткани; с — корень свеклы представляет собой другой тип вторичного роста меристемной ткани с образованием последовательности концентрических слоев камбия.

водящих элементов, расположенных в плотном матриксе паренхиматозной ткани (воздушный межклеточный зазор обычно менее 20%). В некоторых тканях (например, у корней свеклы или батата, рис. 17.4, *c*) образуется несколько слоев камбия. У некоторых культур структуры, похожие на корень, на самом деле являются модифицированным гипокотилем (например, у редиса) или стеблем (например, у картофеля). Съедобные корни являются запасающими органами, в паренхиматозных клетках которых накапливаются крахмал и сахара. Скорость порчи корней зависит от времени сбора (до или после накопления резервных углеводов) и готовности корней к переходу в состояние покоя.

17.2.1.2. Клеточная структура

Для растительных клеток характерно наличие устойчивой формы клеточной стенки и крупной центральной вакуоли (рис. 17.5). Эта клеточная стенка служит своего рода клеточным скелетом, а ее структура, как и происходящие в клетке изменения после сбора урожая, играют большую роль в текстурных свойствах съедобных частей растения. Клеточные стенки — это источник пищевых волокон. Вакуоли растительных

клеток служат местом накопления таких соединений, как сахара, органические кислоты, пигменты и фенольные соединения, которые важны для вкуса и внешнего вида овощей и фруктов. Вакуоли также играют определенную роль в регулировании тургора клеток (внутреннего гидростатического давления), важного для текстурных свойств. Цитоплазма в растительных клетках расположена между клеточной стенкой и вакуолью и разделена двумя мембранами — плазмолеммой (плазматической мембраной), поддерживающей клеточную стенку, и тонопластом, окружающим вакуоль. В цитоплазме находятся органеллы, в том числе пластиды, которые представляют собой двойные мембраны и содержат хлоропласты, состоящие из зеленого пигмента хлорофилла, и другие необходимые для фотосинтеза вещества — хромопласты с каротиноидными пигментами, и лейкопласты, один из типов которых (амилопласты) служит у растительных клеток местом накопления крахмала. В семенах могут присутствовать и белковые тела — органеллы с одной мембраной, накапливающие белок, утилизируемый прорастающим растением и имеющий пищевую ценность для человека.

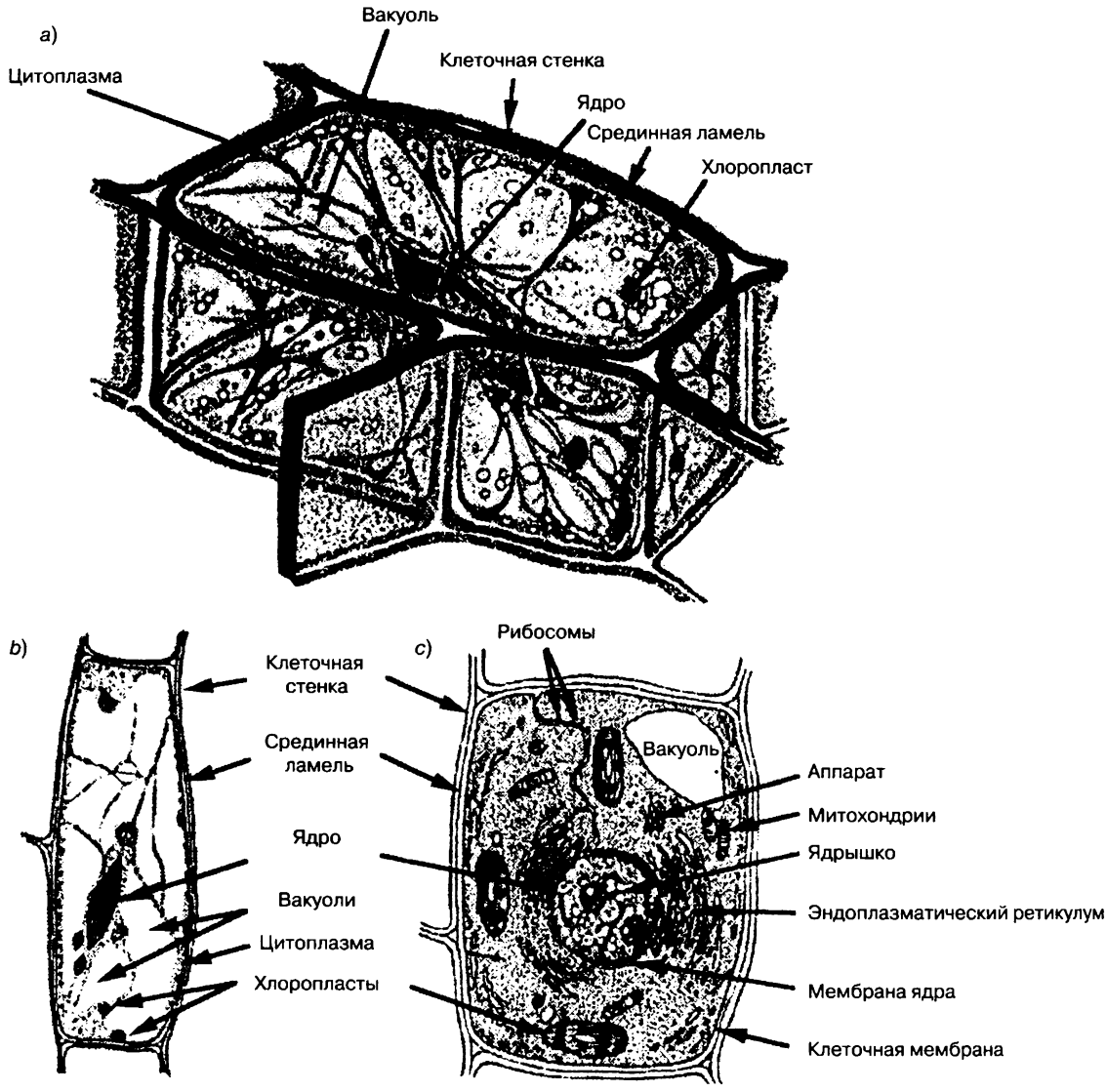
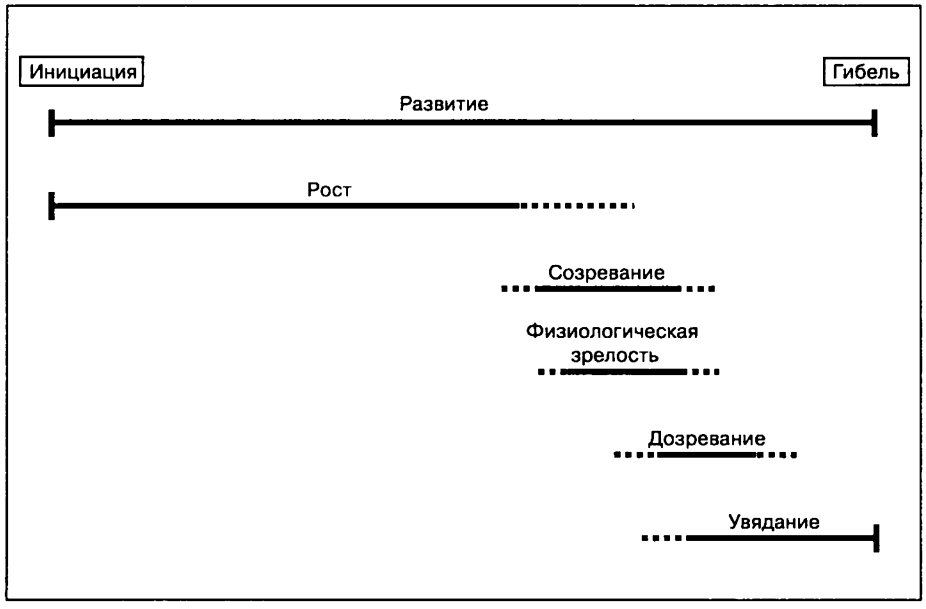


Рис. 17.5. Схематичное изображение зрелой растительной клетки: *a* — под световым микроскопом; *b* — под световым микроскопом (в разрезе); *c* — под электронным микроскопом. По [30]

17.2.1.3. Рост и развитие отдельных частей растительной клетки

Под «развитием» понимают последовательность физиологических процессов — от инициации роста до гибели целого растения или его части (рис. 17.6), тогда как под «ростом» — необратимое увеличение физических характеристик развивающегося растения или его части. Что касается периода после сбора урожая, то важнейшим процессом здесь является «увядание». Другие процессы развития можно прервать путем простого удаления соответствующего органа растения, однако процесс увядания все равно будет продолжаться. Это увядание состоит из последовательности генетически обусловленных изменений, приводящих к неизбежной гибели клеток, тканей, органов и организмов. Особой формой увядания является знакомый многим процесс созревания («дозаривания») фруктов. Большинство операций и технологий на стадии после сбора урожая направлены именно на замедление процесса увядания.



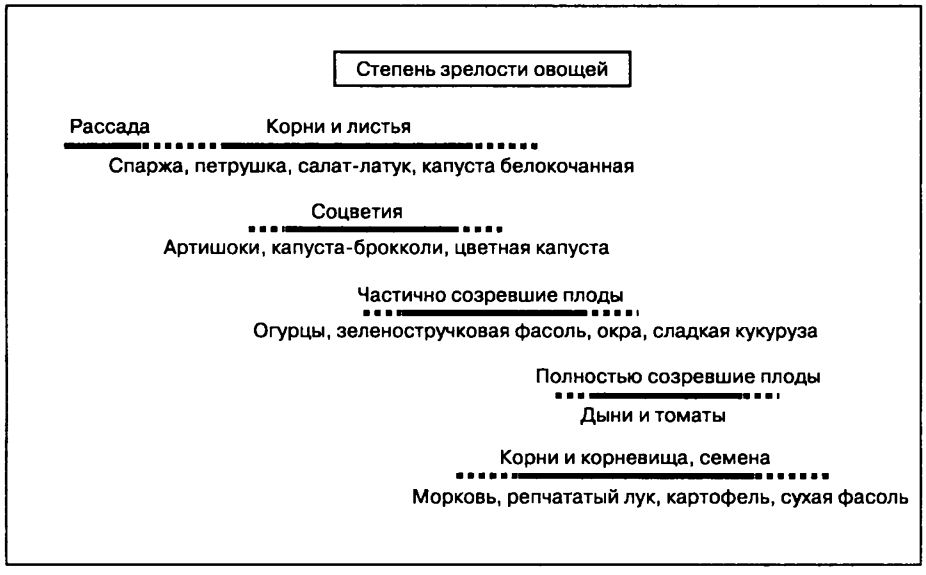


Рис. 17.6. Стадии зрелости в зависимости от стадии развития растения. По [72]

К изменениям, происходящим после сбора урожая, относятся рост (прорастание, укоренение, увеличение в размерах и прорастание семян), увеличение твердости благодаря лигнификации (одревеснения), увеличение содержания пищевых волокон, уменьшение твердости из-за изменений в клеточных стенках и потери тургора, образование поврежденной перидермы как реакция на повреждения, увеличение толщины кутикулы и воскового налета по мере дозаривания плодов.

Специфическая форма увядания различных органов растений четко обусловлена стадией их развития в момент сбора, так называемой «стадией зрелости» (см. рис. 17.6). В этот период растительное сырье соответствует ожиданиям потребителей, и оно может находиться на любой стадии развития того или иного растения. Так, проростки бобов достигают потребительской зрелости уже через несколько дней после прорастания, тогда как корнеплоды картофеля «созревают» только после завершения роста и перехода в состояние покоя. «Потребительскую зрелость» следует отличать от «физиологической зрелости», поскольку последняя — это та стадия развития, когда нужный орган растения способен продолжать свое нормальное развитие независимо от того, отделен он от растения или нет (обычно она соответствует периоду достижения полноразмерности). Примерами физиологически зрелых органов растений могут служить полноразмерные листья, которые затем постепенно увядают, или достигший полного размера плод, который продолжает дозариваться независимо от того, находится ли он на дереве или нет. Процесс созревания — это часть развития, направленная на достижение физиологической или потребительской зрелости.

17.2.1.4. Различия в потребительской зрелости в зависимости от физиологического развития растений

Потребительская (сельскохозяйственная) зрелость — понятие относительное, поскольку может относиться к любой стадии развития растения. Например, проростки или всходы достигают потребительской зрелости на самой ранней стадии своего развития, соцветия, плоды и подземные накопительные органы — гораздо позднее, дольше всего созревают семена и орехи (см. рис. 17.6). Представленные на этом рисунке стадии созревания отдельных морфологических тканей овощей также следует воспринимать как относительные. Например, корнеплоды картофеля собирают после того, как картошка отцвела, а морковь и репчатый лук — до начала цветения растений. Плоды можно разделить на две группы — собираемые на стадии неполной зрелости, физиологически еще не зрелые, и собираемые на стадии полной зрелости, физиологически созревшие, даже полностью спелые. Стадия развития очень важна для определения времени сбора урожая, а также качества растительного сырья и его поведения после сбора.

17.2.2. Дыхание растений

Для роста и размножения живым организмам необходимы сложные метаболические процессы. В ходе этих химических реакций молекулы химических веществ (сахаров, белков, жиров и др.) как образуются (анаболизм), так и расщепляются (катаболизм), высвобождая энергию главным образом в форме аденозинтрифосфата (АТФ). Метаболизация соединений как реакция на условия окружающей среды и генетические программы продолжается в сельхозпродукции даже в отделенных от растения частях вплоть до их гибели вследствие естественных процессов увядания или употребления в пищу. Например, после сбора урожая в отделенных частях растения продолжаются дыхательные процессы и процесс созревания; кроме того, могут заживляться небольшие повреждения благодаря продуцированию защитных соединений как реакции на поражение грибками. Энергия, необходимая для этих процессов, поступает главным образом с кислородом благодаря аэробной респирации («дыханию») — клетки окисляют молекулы углеводов, органических кислот, белков, жиров и т. п., продуцируя энергию, диоксид углерода (CO_2), воду и теплоту. При аэробном дыхании молекулярный кислород (O_2) играет роль финального акцептора электронов. В условиях анаэробного дыхания (без доступа O_2) полного окисления не происходит, и электроны переходят на другие молекулы в той же клетке. Дыхание обеспечивает энергией все реакции обмена веществ, и их скорость отражает общий метаболизм данного растительного сырья. При использовании в качестве субстрата сахара гексозы общее уравнение для аэробной респирации можно записать в следующем виде:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 686 \text{ ккал}.$$

Если для аэробного дыхания используются углеводы, то на каждый моль поглощенного O_2 приходится 1 моль выделенного CO_2. Эта взаимосвязь описывается коэффициентом респирации (*RQ*):

$$RQ = \text{Количество выделенного } CO_2 / \text{ Количество поглощенного } O_2.$$

В зависимости от утилизируемого для дыхания материала это отношение может меняться. Например, при использовании для дыхания высоконенасыщенных жиров $RQ < 1$, а при утилизации органических кислот $RQ > 1$. Коэффициенты респирации некоторых отделенных частей растений приведены в табл. 17.5. Используемый для дыхания субстрат, как и *RQ*, служит характеристикой данной растительной ткани и типа доступного для дыхания субстрата.

Таблица 17.5
Коэффициенты RQ некоторых отделенных частей растений

Части растения	Коэффициент RQ[a]
Листья, богатые углеводами	1,00
Прорастающие зерна крахмала	1,00
Проростки пшеницы в 5–20% O_2	0,95
Проростки пшеницы в 3% O_2	3,34
Проростки льна	0,64
Проростки гречихи	0,48
Зрелые семена льна	1,22
Яблоки:	
незрелые	1,00
зрелые	1,50
перезревшие	1,30
яблоки, обработанные HCN	2,00
яблоки, обработанные парами $CHCl_3$	0,25
Рыхлокочанный салат-латук, ромейн (*Romaine*):	
неповрежденный	1,05
после нарезки	0,63

[a] Отношение выделяемого при дыхании CO_2 к потребленному O_2

Из 686 ккал высвобождаемой энергии около 41% используется на образование АТФ, около 57% сразу же теряется с теплотой и около 2% теряется в ходе расщепления гексозы на более простые молекулы. Вместе с тем энергия, используемая на образование АТФ, почти вся высвобождается в виде теплоты при ее переходе на другие молекулы в целях совершения внутриклеточной работы. Тем самым важным побочным продуктом дыхания является теплота, которую необходимо отвести для избежания нагрева растительного сырья [26].

После отделения частей растения от их источника питательных веществ, воды и других ресурсов, они уже не способны восполнять запасы субстратов (углеводов, органических кислот и т. п.), используемые для дыхания. Хотя количество сухой массы растения, теряемой в результате дыхания в короткие сроки относительно невелико, в долгосрочном плане эти потери могут быть весьма значительными (например, около 1% в месяц).

«Возраст» растительного сырья может исчисляться как временем (в часах, сутках, месяцах и т. п.), так и в физиологических терминах (по скорости метаболических процессов). Относительный срок хранения растительного сырья больше зависит от физиологического возраста, чем от чистого времени. Тем самым, сократив метаболизм (дыхание) в растительном сырье, можно дольше сохранить качество и тем самым увеличить срок хранения. Факторы, важные для минимизации потерь качества растительного сырья после сбора урожая, мы рассмотрим ниже.

17.2.2.1. Респирационные факторы

Интенсивность дыхания во многом зависит от вида сельхозсырья, стадии развития растения и модели созревания. Различным видам растений внутренне присуща разная интенсивность дыхания. Например, капуста-брокколи «дышит» примерно в 10 раз быстрее, чем томаты при той же температуре. Поскольку интенсивность дыхания напрямую связана со сроком хранения сельхозсырья, у растений с интенсивным дыханием (спаржа, брокколи, сладкая кукуруза) соответственно срок хранения меньше, чем у растений с низкой интенсивностью дыхания (арбузы, репчатый лук, картофель). У быстроразвивающихся частей растений (спаржа, цветки капусты-брокколи и др.) дыхание интенсивнее и замедляется, как правило, по мере развития. И наоборот, у частей растений, находящихся в состоянии покоя, или у медленно растущих частей интенсивность дыхания ниже. Поскольку побочным продуктом дыхания является теплота, интенсивно «дышащие» ткани дают больше теплоты, чем «мало дышащие», и во избежание перегрева растений ее необходимо отводить.

После сбора урожая интенсивность дыхания свежего сельхозсырья или постепенно снижается со временем, или сначала снижается, а затем резко возрастает (это явление называют «климактерическим» подъемом), после чего снова снижается по мере увядания ткани (рис. 17.7 и 17.8). Климактерическому подъему предшествует или сопутствует резкое увеличение продуцирования этилена, являющегося газообразным гормоном растений (он выполняет функции промотора и синхронизатора процессов увядания). У плодов с климактерической моделью созревания наблюдаются различные стадии созревания, в том числе расщепление крахмала на простые сахара, потеря тургора тканей, снижение кислотности, изменение цвета и т. п. (овощи и фрукты с климактерической и неклимактерической респирационными моделями приведены в табл. 17.6). Большинство растений с неклимактерической респирационной моделью продуцируют очень мало этилена, но они обычно очень чувствительны к его присутствию, которое приводит к нарушению физиологической активности и ускоренной порче.

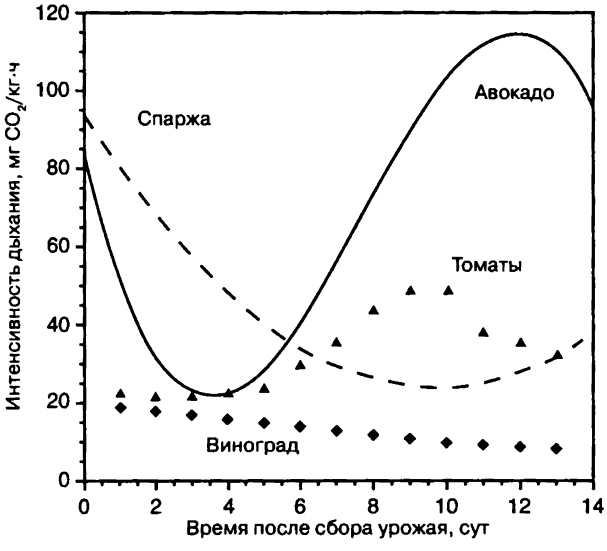


Рис. 17.7. Модели дыхательной (респирационной, респираторной) активности после сбора урожая у стеблей (спаржа), климактерических (томаты и авокадо) и неклимактерических (виноград) плодов. Спонтанное увеличение дыхательной активности у климактерических плодов, как правило, включается понижением концентрации эндогенного этилена. У многих отделенных от растения органов экзогенный этилен и различного рода повреждения могут стимулировать увеличение дыхательной активности, которое не является истинно климактерическим

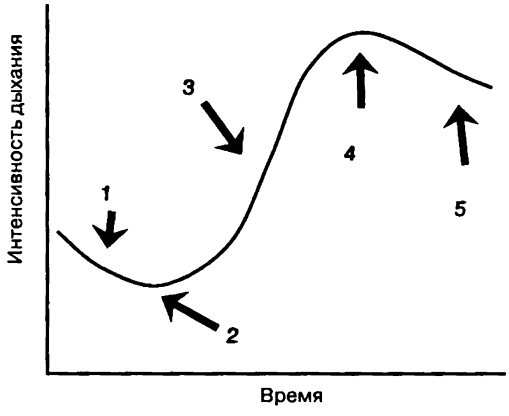


Рис. 17.8. Фазы климактерического дыхания: *1* — предклимактерическое; *2* — минимальная интенсивность предклимактерического дыхания; *3* — климактерическое увеличение интенсивности дыхания; *4* — пик климактерического дыхания; *5* — постклимактерическая фаза

Таблица 17.6
Классификация плодов и овощей в зависимости от их респираторной модели

Климактерические		Неклимактерические	
Яблоки	Мангустан	Ежевика	Оливки
Абрикос	Дыня-канталупа	Какао-бобы	Апельсины
Авокадо	Нектарины	Вишня	Перец
Бананы	Папайя	Крыжовник	Ананас
Черника	Страстоцвет, пассифлора	Огурцы	Гранаты
Плод хлебного дерева	Персики	Финики	Опунция
Капуста-брокколи	Груши	Баклажаны	Тыква
Карамбола	Хурма	Виноград	Малина
Черимойя	Сливы	Грейпфрут	Сквош, тыква большая столовая
Дуриан	Айва	Юююба, «китайский финик»	Земляника
Фейхоа	Рамбутан, Нефелиум	Лимон	Тамарилло
Фиги, инжир	Саподилла	Лайм	Мандарин
Гуава	Сапота	Лонган	Прочие овощные листовые, мясистые и корневые культуры
Джекфрут, плод восточно-индийского хлебного дерева	Анона игольчатая	Мушмула японская	
Киви	Анона	Личи	
Манго	Томаты	Окра	

17.2.2.2. Снижение дыхательной активности и увеличение срока хранения

17.2.2.2.1. Регулирование температуры

Среди внешних факторов наибольшее влияние на дыхательную (респираторную) активность имеет температура, а для снижения респираторной активности и увеличения срока хранения скоропортящегося сельскохозяйственного сырья наиболее эффективно ее правильное регулирование (рис. 17.9). При увеличении температуры на каждые 10 °С респираторная активность возрастает обычно в два-три раза с соответствующим сокращениям срока хранения. Например, в условиях хранения при 20 °С по сравнению с хранением при 10 °С «дыхание» сладкого перца примерно в три раза интенсивнее, а срок его хранения примерно в три раза короче. Как изменяется респираторная активность данного сырья при повышении или понижении температуры, описывает так называемый показатель Q_{10} (температурный коэффициент через каждые 10 °С). Наиболее велики значения Q_{10} обычно между 0 и 10 °С ($Q_{10} = 2{,}5–4{,}0$), а при температурах, близких к температурному пределу, при котором наступает термическая гибель данной ткани, они снижаются до 1 (отсутствие какой-либо респираторной активности). При работе с интервалами температур, большими или меньшими, чем 10 °С, для расчета показателя Q_{10} можно использовать следующее уравнение:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{10/(T_2 - T_1)}$$

где T_1 и T_2 — значения температуры; °С, R_2 — респираторная активность при T_2; R_1 — респираторная активность при T_1.

Если разница температура составляет 10 °С, то

$$Q_{10} = \frac{R_2}{R_1}.$$

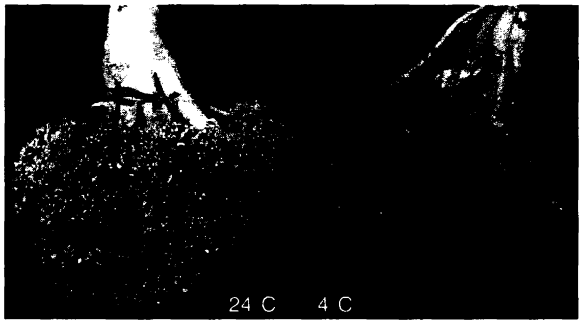


Рис. 17.9. Влияние температуры на качество капусты-брокколи через 48 ч хранения при комнатной (24 °С) температуре или в холодильнике (4 °С). Более светлая окраска брокколи, хранившейся при 24 °С, обусловлена ускоренным расщеплением хлорофилла

Низкие температуры, при которых ткань замерзает, или высокие (50–55 °С) обусловливают термическую гибель ткани. Кроме того, некоторые виды сельхозсырья, например, томаты, огурцы, перец и другие, чувствительны к прохладным температурам, которые, будучи выше температуры замерзания, все равно его травмируют и повреждают. Несмотря на то что респираторная активность при прохладных температурах может или усиливаться, или сокращаться, «дыхание» охлажденных тканей такого чувствительного сырья при повышении температуры обычно резко интенсифицируется. Для улучшения качества и увеличения срока хранения такое сырье следует хранить при максимально низкой температуре, при которой не происходит повреждений, вызываемых охлаждением или замораживанием.

17.2.2.2.2. Состав газовой среды

Основными газами, участвующими в дыхании и других метаболических процессах растений, являются кислород и CO_2. Как правило, снижение содержание O_2 и/или увеличение содержания CO_2 (так называемое «регулирование» или «модифицирование» газовой среды, РГС или МГС, см. далее) уменьшает респираторную активность. Поскольку ткани растений поглощают O_2 и выделяют CO_2, простое помещение растительного сырья в воздухонепроницаемый контейнер приводит к снижению в нем доли O_2 и увеличению доли CO_2. Модифицированная газовая среда вокруг и внутри сырья может быть обеспечена даже любой защитной упаковкой (например, обертыванием пленкой) и промышленными лаками, применяемыми как целенаправленно, так и не намеренно. По мере снижения содержания O_2 и увеличения CO_2 аэробное дыхание замедляется вплоть до некоторой точки, в которой уже не хватает энергии для удовлетворения метаболических потребностей клетки. В этой точке начинает действовать анаэробный механизм метаболизма, восполняющий общее продуцирование энергии клеткой. По мере того как ткань становится все более анаэробной, существенно возрастает продуцирование CO_2, поскольку анаэробное дыхание намного менее эффективно и дает менее одной пятой энергии на одну молекулу продуцируемого CO_2. Конкретные концентрации O_2 и CO_2, обусловливающие начало анаэробной респираторной активности или повреждение тканей, зависят от вида сырья, температуры и других факторов.

На респираторную активность растительного сырья влияют и другие газы, в частности, этилен и CO. Например, в среде этилена или его аналогов ускоряется созревание, повышается респираторная активность и сокращается срок хранения свежей плодоовощной продукции.

17.2.2.2.3. Физические и физиологические стрессы и повреждения

Любой вид физических повреждений (например, в результате падений, проколов и истирания) или стресса (в том числе в результате обезвоживания, действия патогенных микроорганизмов и т. п.) приводит к резкому повышению респираторной активности и сокращению срока хранения.

17.2.3. Экспрессия генов и синтез белка

Экспрессия генетической информации играет огромную роль в судьбе растительного сырья после сбора урожая. Такие физиологические процессы, как прорастание клубней, луковиц и семян, созревание плодов и увядание растений, представляют собой последовательные процессы развития, обусловленные транскрипцией ДНК и передачей мРНК белкам (ферментам). После сбора урожая в различных органах растений отмечаются повышенные уровни специфических ферментов. Например, в созревающих плодах увеличивается содержание альдолазы, карбоксилазы, хлорофиллазы, фосфорилазы, пероксидазы, фенолазы, трансаминазы, инвертазы, фосфатазы, О-метилтрансферазы, каталазы и индолоуксусной оксидазы. Многие из этих ферментов образуются заново (*de novo*) в результате синтеза и характеризуются относительно коротким сроком жизни *in situ* («по месту»). Как правило, увядание растений сопровождается

увеличением синтеза РНК и повышением скорости транскрипции, что, по всей видимости, является абсолютным требованием для продолжения синтеза белка при созревании плодов. Циклогексимид, например, являющийся ингибитором синтеза белка, ингибирует также утрату зеленого цвета, так называемое размягчение (потерю тургора), биосинтез этилена и созревание бананов, обработанных этиленом [10]. Повышение синтеза белка и нуклеиновых кислот наиболее характерно для ранних стадий созревания. Повсеместное распространение медленно созревающих плодов и мутантных их разновидностей с измененной скоростью созревания обусловлено открытием того факта, что созревание плодов контролируется генетически [63]. Более того, были клонированы гены-промоторы увядания растений, экспрессию которых можно блокировать с помощью антисмыслового метода мРНК [48]. Все это свидетельствует о том, что порчу сельхозпродукции после сбора урожая можно контролировать путем изменения экспрессии генов.

17.2.3.1. Технология рекомбинантных ДНК и генная инженерия растительного сырья

Открытие в 1970-х гг. рестрикции (вырезания) и лигирования (соединения) ДНК ферментов позволило разработать методы изменения генома растений. Отдельные гены можно модифицировать путем сайт-ориентированного мутагенеза, получая целевой белок с разными свойствами. Кроме того, стало возможным внедрять в организм, в частности в растение, чужеродную ДНК, получая новое, так называемое трансгенное растение. Несмотря на то, что к таким генно-модифицированным растениям проявлялся большой интерес в связи с возможным увеличением урожайности [7, 19], в настоящее время основное промышленное применение связано с увеличением устойчивости растений в поле к действию пестицидов, насекомых-вредителей и вирусов.

Для повышения урожайности используется несколько стратегий генной инженерии. Так, в мае 1994 г. Управление по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов (*FDA*) США приняло судьбоносное решение, разрешив использовать первый генно-модифицированный продукт, а именно томаты *Calgene's Flavr Savr* [39]. Эти томаты были генетически модифицированы с внедрением в них гена полигалактуроназы (*PG*), одного из нескольких ферментов, образующихся при созревании томатов и катализирующих расщепление пектина, то есть участвующих тем самым в размягчении растительной ткани. При созревании томатов *Flavr Savr* в них блокируется нормальная экспрессия гена *PG* (> 95%), из-за чего процесс размягчения задерживается на несколько суток. В настоящее время разрабатываются или находятся в стадии утверждения другие способы промышленного применения генной инженерии в целях улучшения органолептических, питательных и технологических свойств овощей и фруктов.

17.2.4. Растительные гормоны

Увядание растительных тканей и органов, а также другие процессы развития контролируются и регулируются взаимодействиями между различными гормонами растений (в том числе ауксинами, гиббереллинами, цитокинами, этиленом и абсцизовой кислотой). Растительные гормоны активны даже при очень низких концентрациях и являются важными регуляторами физиологической активности в отделенных от растения частях.

Наибольшее внимание специалистов по физиологии растений после сбора урожая из пяти основных категорий гормонов (рис. 17.10 и 17.11) привлекает один, а именно этилен. Его способность «переключать» созревание климактерических плодов и вызывать увядание растений дала основание называть его «гормоном спелости». Этилен вызывает также прорастание клубней картофеля, и зачастую его называют «гормоном ранимости», поскольку образование этилена стимулируется стрессом вследствие физических или химических повреждений, заражения грибками или γ-облучения. Гиббереллин является гормоном, увеличивающим продуцирование амилазы при солодоращении зерна и размер ягод столового винограда. Это единственный гормон, промышленно применяющийся при работе с растительным сырьем.

17.2.4.1. Роль растительных гормонов в развитии растений

Гормонами, задерживающими увядание, считаются ауксины, гиббереллины и цитокины, тогда как этилен и абсцизовая кислоты его усиливают, то есть являются промоторами увядания. Первая группа гормонов ассоциируются с ростом и развитием путем регулирования деления клеток, роста и созревания,

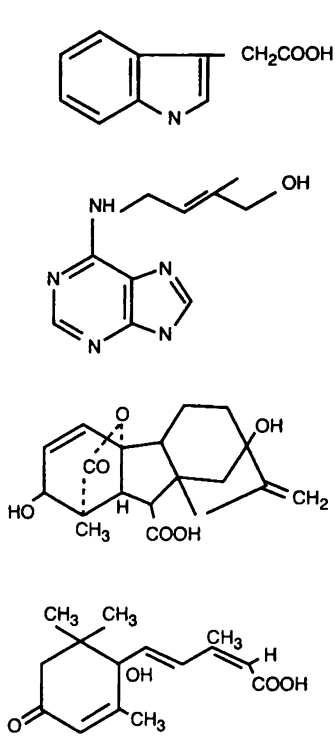


Рис. 17.10. Некоторые растительные гормоны и их структура. Относительно недавно в растительных тканях были выявлены и другие гормоны и гормоноподобные вещества типа жасмоновой кислоты

а вторая группа антагонистична действию других гормонов. Применение ауксинов, цитокинов или гиббереллинов может стимулировать действие «омолаживающих» факторов путем снижения чувствительности растений к действию экзо- и эндогенного этилена. Имеются также данные, что абсцизины, играющие определенную роль в отделенных от растения листьях или других органах, усиливают иные процессы, связанные с явлением увядания, в частности дозаривание фруктов. Похоже, что растительные гормоны совместно контролируют физиологию собранного сельскохозяйственного сырья подобно другим физиологическим явлениям, например прорастанию семян.

Концентрация гормонов в клетке, ткани или органе растения постоянно меняется в ходе развития и регулируется их транспортом (переносом) из одной части растения в другую, синтезом и расщеплением (метаболизмом), деактивацией путем конъюгирования, а также (в случае газообразного этилена) — диффузией из ткани. Имеющиеся данные о естественном уровне различных гормонов в плодах свидетельствуют об их больших межвидовых вариациях (наибольшие изменения характерны для периодов роста и увядания), а также об отсутствии явной корреляции между уровнем экстрагируемых гормонов и стадией развития. Поскольку чувствительность ткани к гормонам также меняется в ходе развития, активность гормонов может меняться и без соответствующего изменения их концентрации. Поскольку роль каждого класса гормонов может быть непосредственно или косвенно обусловлена влиянием других гормонов, определить точный механизм гормонального контроля в растениях очень трудно.

17.2.4.2. Этилен

Этилен представляет собой простой газообразный углеводород, образующийся в любых частях растения в ходе их развития. Эти признаки отличают этилен от других «классических» растительных гормонов, которые синтезируются в определенных тканях или органах, откуда для осуществления своей функции переносятся в другие части растения. Несмотря на то что встречается метаболизм этилена с образованием этиленгликоля и этиленоксида, его концентрация в растениях почти исключительно регулируется скоростью его синтеза и диффузии. Этилен — это широко распространенное соединение, естественным образом продуцируемое растениями, почвенными микроорганизмами, микроорганизмами, патогенными для растений, а также образующееся при выжигании растительного покрова, работе двигателей внутреннего сгорания, флуоресцентных ламп и при воздействии на резину тепла или УФ-излучения, а также содержащееся в сигаретном дыме. Этилен горюч на воздухе при концентрации от 3,1 до 32% об.

17.2.4.2.1. Биосинтез этилена

Биосинтез этилена в растительных тканях включает преобразование S-аденозилметионина (*SAM*) в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (*ACC*) ферментом *ACC*-синтазой с последующим превращением *ACC* в этилен *ACC*-оксидазой. Для синтеза этилена необходим кислород, что объясняет преимущества сокращения содержания кислорода в регулируемой или модифицированной газовой среде для

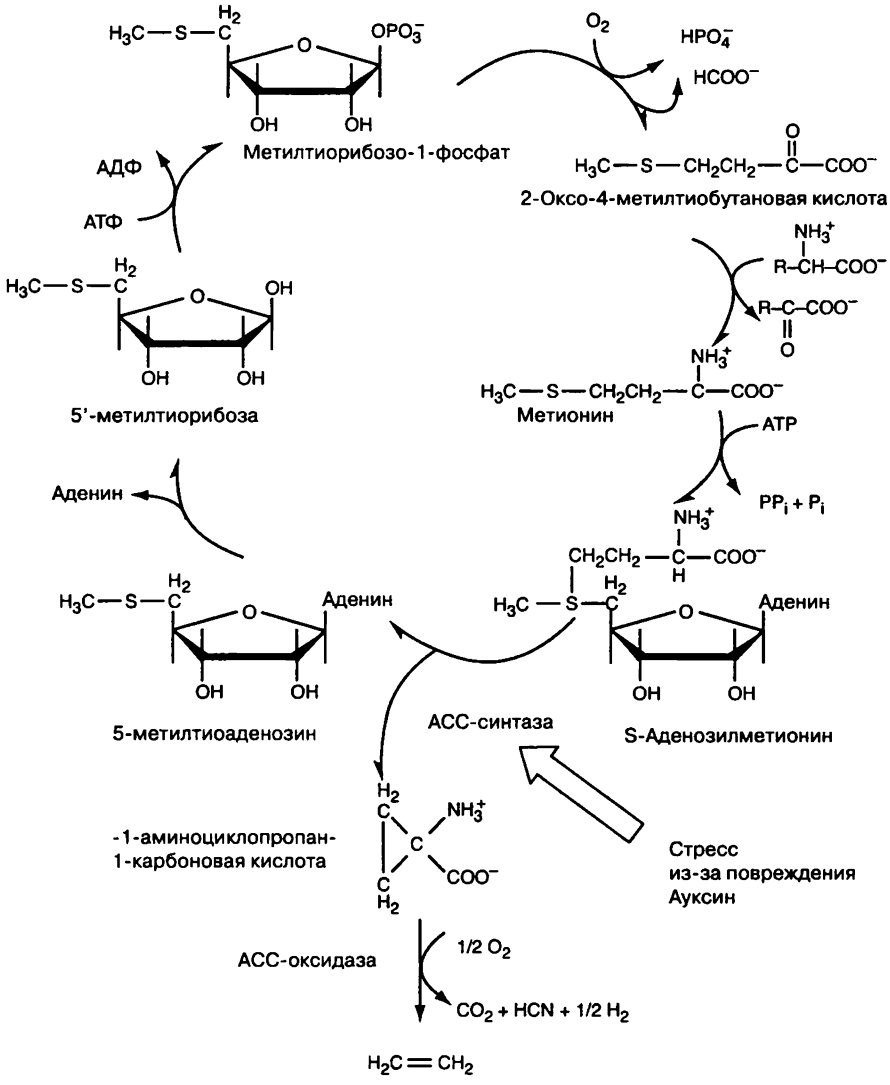


Рис. 17.11. Биосинтез этилена по циклу Янга (*Yang*) в ходе рециклинга метионина (серосодержащей аминокислоты), служащего основным промежуточным продуктом для образования 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (*ACC*)

ингибирования созревания плодов. Метионин регенерируется по метиониновому циклу (см. рис. 17.11) [75]. Цианид, образующийся вместе с этиленом, детоксифицируется в ходе реакции, катализируемой цианоаланинсинтазой [36]:

$$L\text{-цистин} + \text{цианид} \xrightarrow{\text{Цианоаланинсинтаза}} \beta\text{-цианоаланин} + H_2O.$$

Известно несколько ингибиторов биосинтеза этилена, в частности, аминоэтоксивинилглицин и аминооксиацетат, которые ингибируют образование *ACC* из *SAM*, а также салициловая кислота и кобальт, которые ингибируют преобразование *ACC* в этилен.

Для климактерических фруктов характерно значительное увеличение образования этилена в ходе созревания, причем все растительные ткани реагируют на стресс и прочие повреждения путем повышения продуцирования этилена. Образование этилена связано с созреванием климактерических фруктов, а последующие повреждения обусловлены стимулированием существующей мРНК к *ACC*-синтазе. Автокаталитическая особенность синтеза этилена требует удаления даже следовых количеств этого газа из газовой среды при хранении в целях предотвращения чрезмерно раннего созревания плодов. Уже давно

общепризнано, что этилен, как и некоторые его аналоги, стимулирует респираторную активность климактерических и неклимактерических плодов, однако это стимулирование у неклимактерических плодов зависит от постоянного присутствия экзогенного этилена, тогда как у климактерических видов оно осуществляется и в отсутствие экзогенного этилена благодаря автокаталитическому его синтезу. Известно также об ингибировании биосинтеза этилена по отрицательной обратной связи, встречающейся в неклимактерических тканях и незрелых органах климактерических растений, которые еще физиологически не способны инициировать процесс созревания.

17.2.4.2.2. Действие этилена

Этилен обратимо присоединяется к этиленспецифичным рецепторам (их известно пять: *ETR* 1 и 2, *ERS* 1 и 2, а также *EIN* 4) плазматических мембран, представляющим собой трансмембранные белки (гистидинкиназы с кофактором медью) [47]. Связывание этилена с этими рецепторами обратимо, то есть для насыщения отклика необходим избыток молекул этилена. Эти рецепторы этилена являются негативными регуляторами его действия, то есть их функционирование связано с предотвращением конститутивных этиленовых откликов в отсутствие этилена, а связывание этилена «дерепрессирует» пути такого отклика. Связывание этилена с рецептором инактивирует регулятор белка (*CTR* 1, протеинкиназу). *CTR* 1 обычно является негативным регулятором этиленового отклика с помощью негативного регулирования мембранного транспортера белка (*EIN* 2). Инактивация *CTR* 1 инициирует цепь фосфорилирования белка путем активации *EIN* 2. Этот активированный *EIN* 2 запускает последовательность транскрипции с помощью двух семейств транскрипционных факторов (*EIN* 3/*EIL* → *ERF* 1), которые связываются с определенными промоторами в ядре и включают экспрессию генов, приводящую к физиологическим реакциям на этилен.

17.2.4.2.3. Предотвращение влияния этилена

При работе с овощами и фруктами наиболее практичным способом предотвращения влияния этилена представляется его удаление из газовой среды вокруг собранного растительного сырья, например, путем использования вилочных погрузчиков, работающих на электротяге (тем самым не образуются выхлопные газы), удаления созревшего и портящегося растительного сырья, а также путем недопущения смешивания этиленпродуцирующего сырья и сырья, чувствительного к его действию. Кроме того, этилен можно удалять из газовой среды с помощью вентиляции и использованием «поглотителей этилена». Наиболее распространенным таким химическим «поглотителем этилена» является перманганат калия (щелочной $KMnO_4$ в инертных гранулах), по мере активации которого активированный уголь абсорбирует и окисляет этилен. Для окисления этилена также используют озон или УФ-излучение (O_2 + УФ → O_3):

$$C_2H_4 + [O] \rightarrow\rightarrow CO_2 + H_2O$$

При этом в случае использования УФ-излучения с длиной волны 185 нм образуется озон, окисляющий этилен, тогда как УФ с длиной волны 254 нм разрушает остаточный озон, вредный для растительной ткани даже в очень низких концентрациях. Существуют системы, которые каталитически окисляют этилен с помощью платиновых или оксидных катализаторов и нагревания до высоких температур (до 200–300 °C), а также системы низкотемпературного катализа (около 100 °C) с использованием TiO_2 + УФ. И наконец, системы хранения под пониженным давлением (гипобарического хранения) облегчают удаление этилена из тканей овощей и фруктов благодаря увеличению градиента диффузии (см. раздел 17.2.5).

Конкуренты этилена за сайты связывания на рецепторах этилена, которые тем самым ингибируют этиленовый отклик у овощей и фруктов, уже давно вызывают огромный интерес у физиологов растений. Мощным ингибитором этилена является ион серебра, который необратимо присоединяется к рецептору этилена и блокирует его. В настоящее время для предупреждения преждевременного увядания срезанных цветов и букетов широко используется комплекс из тиосульфата серебра, однако его нельзя применять для пищевого растительного сырья. К другим ингибиторам этилена относятся газообразные диоксид углерода, норборнадиен и 1-метилциклопропен (1-*MCP*), которые, подобно серебру, конкурентно ингибируют действие этилена [59]. Ингибирующее действие всех этих соединений проявляется в течение периода от нескольких суток до двух недель в зависимости от конкретного соединения, его дозировки, температуры

хранения и других факторов. Помимо диссоциации (отсоединения) этих ингибиторов от рецептора, потеря ингибирующего эффекта обусловлена также синтезом новых рецепторных белков. Таким образом, этот своего рода «круговорот» рецепторов, вероятно, является важным звеном в изменении чувствительности растений к действию гормонов по ходу их развития.

17.2.4.2.4. Этилен и созревание плодов

Количество этилена, продуцируемого различными плодами, существенно варьирует (табл. 17.7). Климактерические фрукты продуцируют большие количества этилена в процессе созревания незадолго до наступления полной спелости, тогда как неклимактерические — гораздо меньше. Образование этилена созревающими климактерическими фруктами тесно связано с климактерическим повышением респираторной активности, но может наблюдаться как до, так и после такого повышения. Созревание фруктов не всегда сопровождается явно выраженным увеличением содержания этилена до пороговых значений. Скорее всего, это связано с различными изменениями чувствительности тканей к этилену у разных видов фруктов, поскольку способность экзогенного этилена стимулировать такие явления, как созревание, может зависеть от чувствительности конкретных тканей. Например, концентрация этилена, необходимая для инициирования созревания фруктов, снижается по мере достижения данным фруктом полного размера. Аналогичным образом, плод на растении может иметь меньшую чувствительность к этилену, чем отделенный от растения плод. Кроме того, некоторые сорта груш становятся особо чувствительны к этилену только при хранении плодов в условиях охлаждения. Эти наблюдения подтверждают гипотезу, что чувствительность плодов к этилену снижают так называемые «ювенильные факторы», которые могут контролировать физиологические явления, происходящие в незрелых овощах и фруктах. Получение трансгенных растений, не синтезирующих этилен [45, 48], неизбежно доказывает, что этилен является своего рода «переключателем», а не побочным продуктом созревания климактерических фруктов. В промышленности этилен широко применяется для ускорения созревания авокадо, бананов и томатов, а также для устранения зеленоватой окраски неклимактерических грейпфрутов и апельсинов. Обработка плодов этиленом способствует более быстрому и одновременному созреванию климактерических фруктов, а такое ускоренное созревание может означать сокращение времени между сбором и потреблением фруктов, то есть улучшение потребительских качества и пищевой ценности.

Таблица 17.7
Классификация растительного сырья по степени продуцирования этилена

Степень продуцирования этилена	Количество этилена, выделяемого при 20 °С, мкл C_2H_4/кг·ч	Виды сырья
Очень низкая	0,01–0,1	Вишня, цитрусовые, виноград, земляника, гранат, листовые овощи, корнеплоды и картофель
Низкая	0,1–1,0	Черника, огурец, окра, перец, хурма, ананас и малина
Средняя	1,0–10,0	Бананы, фиги, белая мускатная дыня, манго, томаты
Высокая	10,0–100,0	Яблоки, абрикосы, авокадо, дыня-канталупа, фейхоа, киви, нектарины, папайя, персики, груши, сливы
Очень высокая	> 100,0	Черимойя, маракуйя («плод страсти»), сапота, тропический абрикос (плод *Mammea Americana*)

17.2.4.2.5. Этилен и другие физиологические процессы в собранном растительном сырье

Этилен ускоряет созревание и размягчение плодов, а также процессы увядания и утрату зеленого цвета у листовых овощей и некоторых незрелых плодов (например, у огурцов и сквош-тыквы). Этилен вызывает разложение хлорофилла путем стимуляции экспрессии гена хлорофиллазы, хотя ни этилен, ни хлорофиллаза сами по себе не являются необходимыми условиями для разложения хлорофилла. Последний способствует сохранению зеленого цвета овощей, предположительно путем конкурентного ингибирования действия этилена благодаря увеличению концентрации диоксида углерода и ингибирования метаболизма посредством снижения концентрации кислорода и синтеза этилена в частности. Данных о том, что этилен непосредственно влияет на иные пигменты помимо хлорофилла, практически нет.

Кроме того, этилен стимулирует сбрасывание листьев у некоторых распространенных овощей (например, у цветной и кочанной капусты), образование изокумарина, дающего горький вкус, в моркови, лигнификацию различных видов капусты (*Brassica*) и спаржи, продуцирование фитоалексинов* в больных растениях и стрессовых метаболитов у картофеля, образование красно-коричневых пятен у салата-латука и твердой сердцевины у батата. Он также снижает содержание хлорофилла в мускатной дыне и других плодах (если обработка этиленом проводится до хранения при пониженных температурах) путем ускорения созревания и увядания, в результате чего снижается чувствительность сырья к действию температур охлаждения. У кочанной капусты этилен ускоряет потерю массы и сахаров, а также способствует превращениям органических кислот.

17.2.5. Выделение и потеря влаги

Вода (H_2O) обладает многочисленными уникальными свойствами, что делает ее веществом, необходимым для жизни на Земле. Различие в распределении электронов между кислородом и водородом в молекуле воды обеспечивает сильные полярные свойства воды и позволяет образовываться водородным связям («мостикам») между молекулами воды, а также обусловливает многие другие уникальные свойства. Например, полярность воды позволяет растворяться в ней гораздо большему числу веществ, чем это характерно для любой другой жидкости, то есть вода является идеальной средой для большинства внутриклеточных химических реакций. Высокая прочность на разрыв и поверхностное натяжение воды позволяют ей проникать в части растений, расположенные даже на верхушках высоких деревьев. Кроме того, низкая сжимаемость воды повышает внутриклеточное давление (тургор) и обеспечивает прочную текстуру хорошо гидратированного свежего растительного сырья, что очень нравится потребителям.

Содержание влаги в растительном сырье существенно влияет на его качество после сбора урожая и лежкость. На одном конце общего спектра сырья находятся зерно и семена, которые хранят в относительно сухих условиях, поддерживая низкое содержание влаги (например, менее 14%). Хранение во влажных условиях обусловливает развитие плесеней, прорастание и респираторную активность. С другого конца спектра растительного сырья находятся свежие плодоовощные культуры, на 90–95% состоящие из воды. В этом разделе мы основное внимание уделим выделению влаги («выпотеванию») и минимизации ее потерь свежими фруктами и овощами. В этих растительных тканях потеря даже небольшого количества воды (например, менее 1%) может вызывать физиологические изменения, негативно сказывающиеся на качестве и лежкоспособности. Потеря влаги ухудшает внешний вид (в том числе приводит к увяданию, сморщиванию, ускорению развития травматических дефектов и т. д.), текстуру (например, приводит к потере хрустящих свойств, сочности и т. п.) и даже пищевую ценность (ускоряя потерю витаминов А и С). Большинство свежих овощей и фруктов после потери 3–10% массы уже не подлежат реализации. Следовательно, вода представляет собой основную долю от массы реализуемой свежей плодоовощной продукции, то есть потери влаги — это потеря выручки от реализации продукции, продаваемой на вес.

После сбора урожая свежее сырье отделяется от «тела растения», и оно уже не может восполнять потери воды. Тем самым снижение потерь влаги после сбора урожая очень важно для поддержания качества сырья и реализуемой массы продукции. Влага из свежей плодоовощной продукции теряется вследствие испарения в окружающую атмосферу, причем некоторое количество влаги в ходе транспортировки и хранения теряется даже неповрежденным сырьем.

Основной движущей силой потерь влаги является градиент концентрации водяного пара в межклеточном пространстве растительного сырья и в окружающей атмосфере. На итоговую степень потерь влаги влияют также различные барьеры для миграции влаги (например, кутикулярные воски, трихомы (волоски), устьица и т. п.). Для лучшего понимания процесса потерь влаги необходимо определить некоторые важные понятия.

Давление водяного пара (VP) — это парциальное давление водяного пара в воздухе (кПа, мм рт. ст. и др). Вода перемещается (мигрирует) из зон с высоким давлением водяного пара в зоны с низким *VP*.

Давление насыщенного водяного пара (SVP) — это давление водяного пара насыщенного (100%-ная относительная влажность, ОВ) воздуха при данной температуре. Считается, что воздух в межклеточном пространстве растительного сырья имеет давление *SVP*.

* Фитоалексины — защитные фенольные соединения, отсутствующие у здорового растения и образующиеся как ответная реакция на поражение возбудителем. — *Примеч. перев.*

Разница давлений водяного пара (VPD) — это разница между *SVP* и *VP* окружающего воздуха (*VPD* = $= SVP_{\text{ткани}} - VP_{\text{воздуха}}$). Чем больше значение *VPD*, тем сильнее движущая сила для потери влаги сырьем.

Например, по психрометрическим таблицам для определения значений *VP* воздух в помещении при температуре 20 °С и ОВ 45% будет иметь *VP* = 1,1 кПа. Давление насыщенного водяного пара (*SVP*) в воздухе внутри растительного сырья при той же температуре составляет 2,3 кПа. Отсюда *VPD* = 2,3 – 1,1 = = 1,2 кПа. Повышение ОВ в помещении до 90% увеличивает *VP* в нем до 2,1 кПа и снижает *VPD* (то есть движущую силу потерь влаги) до *VPD* = 2,3 – 2,1 = 0,2 кПа. Следовательно, чем ниже ОВ окружающего сырье воздуха, тем больше будет *VPD* и тем быстрее будет теряться влага. В большинстве случаев рекомендуется поддерживать ОВ между 85 и 95%. Если требуются более высокие значения ОВ (например, 95–100%), тару следует изготавливать из водонепроницаемого материала (картонные коробки будут портиться). 100%-ная ОВ рекомендуется только в тех случаях, когда растительное сырье и контейнеры для него водостойки (могут переносить действие свободной воды при мойке и гидроохлаждении, а также стойки к действию конденсата), например, капуста-брокколи.

Существенно уменьшает *VPD* и потери влаги снижение температуры хранения. Если воздух при ОВ 45% из предыдущего примера будет иметь температуру 0, а не 20 °С, то *VP* = 0,3 кПа, *SVP* = 0,6 кПа, а *VPD* = 0,3 кПа (вместо 1,2 кПа). Тем самым потери влаги можно минимизировать путем быстрого охлаждения сырья до минимально низких возможных температур, не вызывающих повреждения сырья, и минимизации температурных перепадов в ходе транспортных и погрузочно-разгрузочных операций.

Скорость потери влаги (*J*; %/сут, г/ч и т. п.) можно рассчитать по *VPD*, зная константу пропорциональности (*K*), используя уравнение: $J = K \quad VPD$. Константа пропорциональности учитывает все факторы, кроме *VPD*, в том числе физиологическое состояние сырья и анатомические барьеры для диффузии влаги (например, кутикулярные воски, трихомы, устьица и т. д). После проведения эмпирических измерений при известных *VPD*, рассчитывают *K* и затем ее используют для прогнозирования потерь влаги данного сырья при разных условиях, в том числе при охлаждении, под действием низких и высоких температур и др.

Сырье с большой площадью поверхности (например, листья) гораздо больше подвержено потере влаги, чем компактное и округлое (например, картофель). Также предупреждают потери влаги естественные барьеры, в частности содержащие воски кутикулы или увядший слой. Например, отсутствие открытых пор в кожуре томатов делает их менее подверженными потере влаги, чем огурцы — именно поэтому огурцы зачастую смазывают воском или обертывают в усадочную пленку. Очевидно, что порезы и потертости нарушают эти естественные барьеры и увеличивают потери влаги, так что осторожное обращение с растительным сырьем — это первый шаг для сокращения потерь влаги.

Даже если относительная влажность в помещении относительно невелика, вокруг растительного сырья образуется слой насыщенного воздуха (так называемый «граничный слой»), который ограничивает диффузию водяного пара в пространство помещения. Пушок или волоски на поверхности некоторых видов растительного сырья способствуют сохранению этого граничного слоя и снижают потери влаги. Ту же цель преследует обертывание пластиковой пленкой и прокладки (лайнеры) в картонных коробках. И наоборот, быстрое движение воздуха вокруг растительного сырья нарушает этот граничный слой и поддерживает довольно высокий градиент концентрации водяного пара и тем самым потерю влаги. Ограничение движения воздуха вокруг охлажденного растительного сырья позволяет граничному слою вновь сформироваться вокруг продукции и замедлить потерю влаги. Некоторые практические меры по снижению потери влаги овощами и фруктами приведены в табл. 17.8.

17.2.6. Реакция растений на стресс

В ходе всего своего жизненного цикла неповрежденное растение должно реагировать на различные физические и химические «вызовы» (повреждающие факторы) окружающей среды. Реакция растения на стресс или изменения в окружающей среде обычно направлена на защиту, например, на предупреждение потери влаги, адаптацию к температурным экстремумам или на создание физических или химических барьеров для патогенных микроорганизмов. Различные стрессы порождают аналогичные реакции, связанных обычно с продуцированием «стрессовых» белков и метаболитов-антиоксидантов [11]. Когда ткань не может успешно противостоять какому-либо «вызову», отклик может проявляться в гиперчувствительности,

Таблица 17.8
Некоторые меры по снижению потерь влаги

Осторожное обращение со свежими овощами и фруктами
Подсушивание некоторых корнеплодов, корней и корневищ, позволяющее развиться в местах повреждений натуральным тканям, ограничивающим потери влаги
Использование восков и других покрытий в целях ограничения потери влаги
Быстрое охлаждение растительного сырья и поддержание температуры на максимально возможном безопасном низком уровне (то есть выше температур охлаждения и замораживания)
Минимизация различий сырья по качеству и колебаний температуры воздуха
Снижение скорости вентиляторов в камерах для хранения охлажденного растительного сырья. Использование оберточной пленки, пластиковых лайнеров и других видов упаковочных материалов, снижающих потери влаги
Увлажнение воздуха в камере хранения сырья с помощью специальных увлажнителей или путем смачивания полов
Поддержание относительной влажности на максимально высоком возможном уровне, не вызывающем порчу сырья или его упаковки
Правильное проектирование систем охлаждения, чтобы отклонение температуры испарителя от температуры воздуха не превышало 1 °С
Использование в контейнерах для сырья, способного переносить прямой контакт с водой (например, листовые овощи, горох, фасоль, сладкая кукуруза) ледяной крошки или распыление водяного тумана в прилавках-витринах
Если известна переносимость сырьем CO_2, зачастую можно оставлять открытым отверстие для воздуха в закрытых или частично закрытых транспортных средствах и контейнерах, что позволяет поддерживать более высокую относительную влажность

например, в генетически обусловленном отмирании группы клеток. Соединения-антиоксиданты в растениях, в частности аскорбиновая кислота, каротиноиды, флаванолы, фенольные кислоты и токоферолы, предназначены для защиты растения от окислительного и других стрессов, но все больше признается их огромная пищевая роль в защите человека от хронических заболеваний типа атеросклероза, коронарной недостаточности и некоторых видов онкологических заболеваний [43, 67].

Очень важно понимать, что специфические отклики различных видов растений на физические, химические и микробиологические «вызовы» могут существенно отличаться. Важность этого обстоятельства обусловлена тем, что из-за данного факта не может существовать одних и тех же одинаковых условий хранения или обработки для увеличения срока хранения всех овощей и фруктов. До и после сбора урожая качество скоропортящегося растительного сырья может снижаться под действием самых разных сортовых или экологических факторов. Кроме того, овощи и фрукты подвергаются при переработке действию различных физических нагрузок и напряжений, выражающихся в порезах, царапинах, потертостях и т. п. Нарушения без каких-либо видимых грибковых, бактериальных, вирусных или вызванных насекомыми причин называют «физиологическими нарушениями», которые можно разделить на две большие группы:

а) обусловленные неблагоприятными температурными режимами;

б) вызванные физиологическими расстройствами при обычной для данного продукта температуре.

17.2.6.1. Физические повреждения

Повреждение органов растений обычно приводит к временному и локализованному резкому усилению респираторной активности, продуцированию этилена и быстрым превращениям некоторых клеточных компонентов, а иногда — к накоплению специфических метаболитов или продуктов реакций, выполняющих защитные функции. В мясистых органах поврежденные клетки начинают синтез информационных РНК (иРНК) и белков. Несмотря на то что влияние этих физиологических реакций при повреждении растений до конца не ясно, имеется достаточно примеров, чтобы проиллюстрировать важность этих явлений.

17.2.6.1.1. Защитные вещества

Отклик органов растений на стресс может сопровождаться «заживлением ран», то есть образованием физического барьера из защитных веществ. Так, у некоторых видов растений происходит образование смолистого или воскоподобного барьера, «опробкование или формирование лигнифицированного слоя,

и такие барьеры успешно препятствуют инвазии сапрофитов и последующей порче. Соответственно, после сбора урожая некоторых культур, например картофеля, желательно обрабатывать сырье или хранить урожай в условиях, способствующих такому заживлению. Эти условия обычно отличаются от тех, которые используются для обеспечения максимального срока хранения после заживления повреждения. Заживление повреждений особенно важно при механической уборке урожая, поскольку при ней поверхность картофеля сильно истирается. У некоторых видов овощей, в частности у спаржи, наиболее проблемными являются порезы, возникающие при уборке и стимулирующие отложения лигнина, которые ухудшают нежность и сочность спаржи.

17.2.6.1.2. Стрессовые метаболиты

Повреждения растений могут приводить к синтезу и накоплению широкого спектра веществ, которые в целом называют «стрессовыми метаболитами» [23]. В некоторых случаях их накопление наблюдается только тогда, когда механические повреждения сопровождаются другими факторами, например, наличием этилена или температурами охлаждения. К стрессовым метаболитам относят широкую группу химических соединений, включая изофлавоноиды, дитерпены, гликоалкалоиды и полиацетилены (рис. 17.12), выполняющих функцию защиты растения благодаря их антибиотическим свойствам. Вместе с тем они могут снижать качество из-за придания продуктам горечи (например, кумарины в моркови, фуранотерпены в батате или гликоалкалоиды в картофеле) и иногда токсичности. Некоторые стрессовые метаболиты являются также прекурсорами (предшественниками) для неферментативных реакций потемнения (реакций Майяра).

17.2.6.2. Температурные экстремумы

17.2.6.2.1. Повреждения при замораживании

Снижение температуры ниже точки замерзания данной ткани приводит к холодовому повреждению, нарушению с таким симптомами, как образование сочащихся водой участков, сжимание и даже разрыв эпидермиса. Такие низкие температуры могут наблюдаться как в поле, так и в хранилищах (вследствие сбоев в работе холодильного оборудования), а также при транспортировке из-за экстремально низких температур окружающей среды.

Присутствие в клеточном соке растворенных веществ снижает точку замерзания растительных тканей по сравнению с точкой замерзания чистой воды. Это снижение точки замерзания, являющееся функцией осмоляльности клеточного сока, составляет несколько градусов Цельсия, и зачастую бывает ниже 1 °С (табл. 17.9). Высокосахаристый виноград не замерзает до тех пор, пока температура не опустится ниже – 5,0 °С, тогда как листовые овощи типа салата-латука замерзают уже при температуре чуть ниже 0 °С. Знание того, как происходит замораживание растительных тканей, очень важно для своевременного понимания его симптомов.

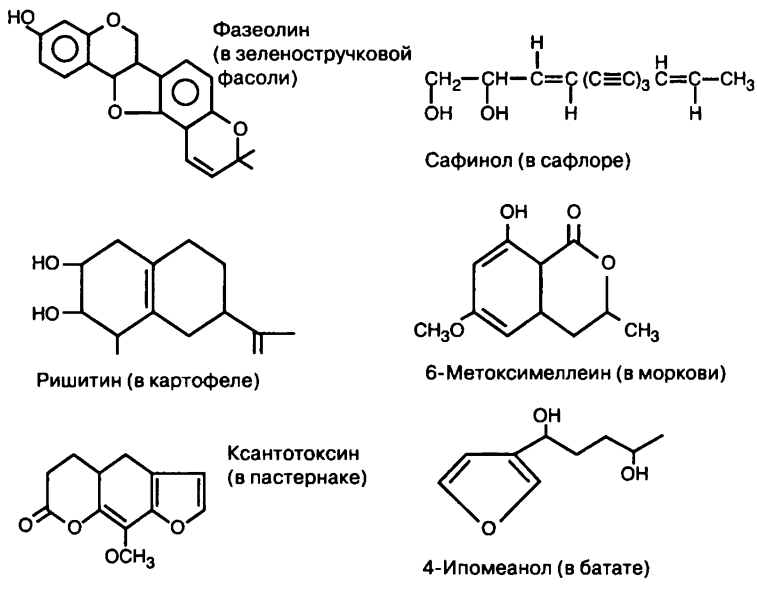


Рис. 17.12. Некоторые стрессовые метаболиты съедобных растений. Эти соединения представляют широкое семейство других соединений, накапливающихся в тканях растения, подвергающихся стрессу, и называемых специалистами по патологии растений «фитоалексинами» из-за их антибиотического действия. В больших количествах некоторые из этих соединений токсичны для млекопитающих

Таблица 17.9
Температуры замерзания некоторых распространенных овощей и фруктов

Растительное сырье	Диапазон температур замерзания, °С
Яблоки	−2,2 ... −1,7
Спаржа	−1,4 ... −1,1
Вишня	−4,3 ... −3,8
Огурцы	−0,9 ... −0,8
Виноград	−5,3 ... −2,9
Салат-латук	−0,6 ... −0,3
Репчатый лук	−1,3 ... −0,9
Апельсины	−2,3 ... −2,0
Картофель	−1,8 ... −1,7
Томаты	−1,0 ... −0,7

Когда температура ткани падает ниже точки замерзания, кристаллы льда образуются не мгновенно, так как растительные ткани могут существенно переохлаждаться — в течение некоторого времени клеточная жидкость остается жидкой и при температуре ниже точки замерзания. Во многих ситуациях короткие периоды пребывания в условиях температур замораживания не повреждают ткани, поскольку они переохлаждаются и вновь согреваются без образования льда. Тем не менее, в некоторых ситуациях переохлаждение может оказаться гибельным из-за высокой скорости замораживания, когда переохлажденный раствор замерзает или из-за длительного действия низких температур, или из-за образования ядер кристаллов льда вследствие вибрации. Внезапное замерзание переохлажденных тканей, вероятно, включает замораживание цитоплазмы и вакуолярной жидкости, что является гибельным для растения. При размораживании эти ткани начинают сочиться водой, становятся дряблыми и легко поражаются грибками.

Если образование ядер кристаллов льда происходит задолго до появления явления переохлаждения, то в жидкости клеточной стенки и в межклеточной жидкости образуются кристаллы льда. В этой типичной ситуации рост кристаллов льда в жидкости клеточной стенки увеличивает значение *VPD* клеточной мембраны, и кристаллы льда начинают расти за счет внутриклеточной жидкости, которая может плазмолизоваться. Такой вид замораживания не обязательно будет гибельным для растения — все зависит от влияния дегидратации на плазматическую мембрану и риска нарушения ее непроницаемости, когда кристаллы льда вырастают внутрь клетки, в пространство, оставшееся после плазмолизации цитоплазмы. Естественная сублимационная сушка, происходящая при таком процессе, снижает точку замерзания клеточной жидкости путем повышения ее осмоляльности, делая тем самым ткань более стойкой к замораживанию межклеточного пространства. В тканях с большим заполненным воздухом внеклеточным пространством, внеклеточные кристаллы льда могут образовываться без повреждения клеток. При размораживании такие ткани сначала сочатся водой из-за избыточного количества жидкости в межклеточном пространстве, но затем вновь ее впитывают, и плазматическая мембрана остается неповрежденной.

17.2.6.2.2. Повреждения при охлаждении

У большинства видов тропических и субтропических растений, и даже некоторых растений умеренного климата при воздействии на них температур ниже некоторого критического порога, но выше их точки замерзания встречаются симптомы физиологического расстройства, называемого «холодовым повреждением» (*CI, chilling Injury*) [70]. Степень таких повреждений зависит и от температуры, и от длительности ее воздействия, однако пребывание чувствительной ткани в условиях температур ниже пороговых даже не слишком длительное время вызывает повреждения и снижает качество и срок хранения. Холодовые повреждения может встречаться и в поле, и при транспортировке, и при реализации, и в домашних условиях, причем негативное воздействие накапливается и носит кумулятивный характер. Известны случаи восстановления растительных тканей после недолго пребывания в условиях потенциально вредных температур. Иногда предупредить симптомы *CI* можно с помощью промежуточного подогрева в ходе хранения (возможно, благодаря метаболизму или детоксикации вредных веществ).

Подобное расстройство, характеризуемое повышением подверженности грибковому обсеменению, разрушением и некрозом растительных тканей, выделением тканевого сока и иногда гибелью растения, имеет особо важное значение для тропического и субтропического растительного сырья. К иным симптомам *CI* относятся изменение цвета растительной ткани (например, у яблок и груш), изменение цвета прожилок (например, у авокадо и бананов), появление темных пятен на эпидермисе (например, у цитрусовых, огурцов, перца и томатов) и некроз семян у перца и томатов. Пороговые для *CI* температуры зависят от вида растительного сырья и бывают выше тех, которые вызывают появление визуальных симптомов независимо от срока хранения. Эти пороговые температуры находятся зачастую в диапазоне 10–15 °С, но могут варьировать от довольно низких (например, 3 °С для некоторых сортов яблок) до высоких (некоторые специи или ананасы из австралийской провинции Квинсленд повреждаются даже при 20 °С).

Причины *CI* уже долгие годы вызывают большой интерес ученых, но до сих пор не ясно, существует ли универсальный механизм холодовых повреждений. Тем не менее, развитие симптомов *CI* обычно относят на счет нарушения равновесия метаболических реакций, что приводит к недостаточному продуцированию некоторых эссенциальных и «перепроизводству» токсичных для ткани метаболитов. Например, с холодовым повреждением некоторых фруктов связывают накопление этанола, ацетальдегида и щавелевоуксусной кислоты. Данные работы [54], где исследовалось резкое нарушение митохондриальной респирации относительно Аррениусовской зависимости, позволили авторам сделать вывод о резком изменении в этой точке энергии активации некоторых важнейших для респираторного механизма ферментов. Тот факт, что этот температурный порог оказался близок к той температуре, при которой клеточные мембраны чувствительных к холоду растений переходят из жидкого в кристаллическое состояние (то есть в них наблюдается фазовый переход), подтверждает, что именно этот фазовый переход играет главную роль при охлаждении таких растений, меняя энергию активации связанных с жирами респираторных ферментов. В ходе более детальных исследований эта упрощенная картина была несколько модифицирована, но по-прежнему очень вероятно, что наиболее ранними явлениями при холодовом повреждении являются фазовый переход в мембранной жидкости и изменение ее структуры и функционирования.

Вскоре после того, как температуры охлаждения начинают ощущаться клеткой, происходит резкое изменение строения цитоплазмы, и она перестает быть текучей. Длительное пребывание ткани в условиях низких температур при последующем ее нагревании приводит к глубоким изменениям в текучести и локализации цитоплазматической жидкости. Эти явления могут играть важную роль в симптомах *CI*. Неспособность клетки транспортировать субстраты и метаболиты, а также контролировать молекулы приводит в результате к нарушению метаболизма и накоплению токсичных респираторных производных.

У близкородственных видов растений были выявлены различия в чувствительности важнейших регуляторных ферментов (например, фосфофруктокиназы) к холодовым повреждениям, а поскольку эти ферменты играют важную роль в регулировании общего метаболизма, вполне возможно, что причиной появления симптомов *CI* может быть именно нарушение их функциональности.

Растения должны постоянно предупреждать или блокировать образование способных к реакции с кислородом веществ (*ROS*), включая супероксид-анионы (O^{-}_{2}), гидроксильные ионы ($^{\bullet}OH$), синглетный кислород ($^{1}O_{2}$) и пероксид водорода (H_2O_2). Кислородо-активные вещества могут повреждать важнейшие клеточные мишени — ДНК, и белки. В развитие симптомов *CI* может быть вовлечено также пероксидирование мембранных липидов, часто встречающиеся у растений, подвергаемых холодовому стрессу. Чувствительные к нему растения в условиях температур ниже пороговых могут быть не способны использовать систему мобилизации антиоксидантной защиты или «ремонта» ферментов.

Помимо различий в чувствительности к холоду у растений разных видов существуют и внутривидовые, и даже сортовые различия. Чувствительность к холодовому повреждению может быть обусловлена условиями выращивания и стадией физиологической зрелости (по мере роста и созревания овощи и фрукты становятся менее чувствительны к *CI*). У некоторых видов растительного сырья воздействие пониженных температур, которые несколько выше температур охлаждения, позволяет тканям «привыкнуть» к температурам охлаждения и снижают их чувствительность к *CI*. Кроме того, чувствительность томатов и манго к *CI* снижается при непродолжительном их пребывании при температуре около 38–55 °С. Время такого выдерживания варьирует от нескольких суток при температурах вблизи нижнего предела до нескольких минут вблизи высшего. Подобная стойкость к *CI*, индуцированная действием повышенных температур,

может быть обусловлена «перенаправлением» синтеза белков на термошоковый путь, благодаря чему фрукты защищаются от *CI* путем снижения синтеза других стрессовых белков. Будучи шаперонами*, такие термошоковые белки могут также защищать другие белки от свертывания, развертывания, комплексирования и декомплексирования, обусловленных холодом.

К другим способам уменьшения холодовых повреждений относят хранение сырья в условиях регулируемой газовой среды (РГС), особенно с повышенным содержанием CO_2, а также вакуумная инфузия в плоды Ca^{2+} — оба эти способа существенно снижают развитие *CI*. Вместе с тем вполне вероятно, что они позволяют лишь «лечить симптомы», а не «саму болезнь», поскольку и регулируемая газовая среда, и Ca^{2+} замедляют метаболическую порчу.

17.2.6.2.3. Высокотемпературные повреждения

Характерные повреждения некоторых растительных тканей могут быть обусловлены и действием повышенных температур. Например, хранение многих видов плодоовощной продукции при температурах выше 30 °С нарушает нормальный ход дозаривания, а яблоки при воздействии температуры 55 °С в течение нескольких минут приобретают симптомы, характерные для холодовых повреждений. Высокие температуры могут ингибировать важнейшие ферменты и тем самым нарушать нормальный метаболизм (в том числе ход созревания). У многих видов растительного сырья прямой солнечный свет может вызывать повышение температуры тканей до стрессового уровня. В некоторых случая, например при «зеленом плечике» у томатов, ткани так и не созревают. Высокие температуры в помещениях для дозаривания могут приводить к «слипанию» бананов, и плодам не удается созреть «правильно». Повышение температур растительных тканей может привести к гибели клеток, в результате чего растительное сырье сморщивается или обесцвечивается. Особенно чувствительны к солнечному ожогу собранные фрукты из-за их пониженной способности к охлаждению путем испарения. Кроме того, повреждения могут возникать вследствие погружения плодов в горячую воду, иногда применяемого для контроля грибкового обсеменения.

17.2.6.3. Действие ионизирующего излучения

В целях увеличения сроков хранения некоторых овощей и фруктов в экспериментальном и промышленном режиме было успешно испытано применение слабых доз ионизирующего излучения. Ингибирование прорастания картофеля, репчатого лука и моркови, а также успешная борьбе с насекомыми-вредителями плодов, овощей и зерна достигается при дозах 0,1-0,25 кГр. Контроль обсемененности патогенными бактериями достигается при дозах 0,7–1 кГр, а роста плесеней — при дозах свыше 1 кГр. Дозы порядка 1 килогрея (1 кГр) способны на время или постоянно ингибировать начало созревания плодов. Более высокие дозы, которые необратимо нарушают ход нормального созревания плодов, приводят к неспособности ткани восстанавливаться после радиационного повреждения. Низкие дозы облучения (менее 1 кГр) вызывают резкое увеличение содержания этилена в области повреждения, а также ингибируют последующую стимуляцию его образования и активность *ACC*-оксидазы.

К сожалению, при обработке ионизирующим излучением более 1–2 кГр, качество овощей и фруктов ухудшается, происходят негативные изменения текстуры, вкуса и аромата. Более того, низкие дозы, применяемые для ингибирования прорастания, могут препятствовать заживлению повреждений, что препятствует промышленному внедрению данного метода в целях увеличения срока хранения картофеля.

Физиологические изменения, вызываемые облучением (особенно высоких его доз), могут привести к гибели клеток. У облученного растительного сырья зачастую проявляются характерные симптомы повреждений — так, например, у яблок, облученных дозами до 10 кГр, появляется кольцо из отмерших тканей, несколько похожее на слой мякоти, окружающей сердцевину с семенами. У цитрусовых и бананов при дозах около 0,25 кГр появляются пятна на кожуре. У многих видов сырья существенно размягчается мякоть из-за активирования пектиновых ферментов. Несмотря на все эти трудности, последнее время вновь растет интерес к применению ионизирующего излучения в целях увеличения сроков хранения овощей и фруктов, что обусловлено запрещением использования в этих целях метилбромида, разрушающего

* Шапероны — класс белков, главная функция которых состоит в восстановлении правильной третичной структуры поврежденных белков, а также образование и диссоциация белковых комплексов. — *Примеч. перев.*

озоновый слой, а также необходимостью карантинной фумигации насекомых-вредителей и усилением внимания к защите продовольствия от намеренной или ненамеренной его контаминации микроорганизмами, патогенными для человека. Как и в случае других способов увеличения срока хранения, указанные выше ограничения можно преодолеть путем использования и контроля соответствующих технологических параметров, а именно стадии спелости, температуры и правильного выбора состава газовой среды.

17.2.6.4. Дефекты, обусловленные составом питательных веществ

Большое число физиологических нарушений у овощей и фруктов до и после сбора урожая обусловлено нарушением поступления питательных веществ в развивающиеся органы растений. Так, у растений в большом числе важных физиологических процессов участвует кальций, который влияет на структуру клеточных стенок, на мембраны, хромосомы и активность ферментов. Кроме того, по данным некоторых исследователей эндогенный кальций выполняет также важные регуляторные функции при созревании. Пока еще не известно, как именно кальций оказывает положительное воздействие на отделенные части растений, но некоторые существенные физиологические дефекты являются результатом недостатка кальция, в частности горькая ямчатость яблок, пятна на кожуре груш, почернение сердцевины кочанной капусты, а также грибная гниль цветков и плодов томатов и дынь. У некоторых видов собранных фруктов наличие пробкоподобных (одревеснеевших) участков в мякоти является следствием дефицита бора, однако зачастую эти дефекты при сборе урожая не заметны и визуально проявляются только через некоторое время при хранении. Контроль подобных обусловленных дефицитом питательных веществ дефектов обеспечивают разными способами, в том числе подбором наиболее стойких сортов, применением соответствующей химической обработки (как в поле, так и после сбора урождая, например, погружение в раствор кальция или введение таких растворов в плоды под вакуумом), а также сбор урожая в период соответствующей зрелости. Хранение в условиях РГС снижает встречаемость горькой ямчатости и других дефектов яблок.

17.2.6.5. Дефекты, обусловленные применением токсичных химических соединений

Некоторые поверхностные пороки являются следствием действия на растительное сырье после сбора урожая токсичных веществ. К таким веществам относятся аммоний (применяемый в качестве хладагента), диоксид серы (SO_2, содержащийся в дыме работающих на угле тепловых электростанций и применяемый как фунгистатическое средство при обработке винограда), $CaCl_2$ (используемой для борьбы с горькой ямчатостью яблок), а также метилбромид, применяемый при фумигации. Эти пороки обычно проявляются в виде темных пятен на поверхности растительного сырья, клетки в которых погибли или повреждены. Нежелательные физиологические нарушения у овощей и фруктов бывают вызваны и другими химическими веществами. Например, после сбора урожая сырье бывает подвержено воздействию различных атмосферных загрязнений, что особенно часто наблюдается в густонаселенных районах. Выхлопные газы автомобилей, особенно этилен, ускоряют омертвение (некроз) тканей растений, а летучие соединения фотохимического смога (O_3, пероксиацилнитраты и NO_2) приводят к появлению нежелательных симптомов повреждений у большого числа видов овощей и фруктов.

17.3. Химический состав растительных тканей

В заготовленных частях растений, как и во всех живых организмах, содержится много разных химических соединений с большими вариациями по составу. Примерный состав основных съедобных экономически важных растительных тканей приведен в табл. 17.10. Несмотря на очевидные межвидовые различия, состав отдельных органов растения, состоящих преимущественно из живых метаболически активных тканей, более или менее постоянен. Скорость и глубина химических изменений зависит от условий выращивания до сбора урожая, физиологической роли данной части растения, генетического пула конкретной клетки и условий окружающей среды после сбора урожая.

Химический состав растительного сырья очень важен из-за его влияния на состав питательных веществ в человеческом рационе (табл. 17.11) [20]. Знание химического состава пищевых продуктов растительного происхождения и его изменений очень важно и для понимания влияния на нутритивные свойства пище-

Таблица 17.10

Границы содержания основных групп веществ в важнейших группах съедобных растительных тканей

Растительные ткани	Вода	Углеводы	Жиры	Белки
Фрукты	80–90	5–20	0,1–0,5	0,5–3
Овощи	80–90	2–20	0,1–0,3	5–7
Бобовые, семена	10–50	6–60	1–18	5–25
Орехи	3–50	10–40	2–70	3–25
Зерно	12–14	65–75	2–6	7–12

Таблица 17.11

Доля нутриентов из растительного сырья относительно общего потребления нутриентов и пищевой ценности. По [66]

	Макронутриенты								
Пищевой продукт	Энергетическая ценность	Углеводы	Пищевые волокна	Белок	Общий жир	Насыщенные жиры	Мононенасыщенные жиры	Полиненасыщенные жиры	Холестерин
Бобовые, орехи, соя	3,1	2,1	14,3	6,3	3,8	2,1	4,0	5,6	0
Зерновые продукты	23,9	38,7	36,1	22,2	2,5	1,7	1,3	4,4	0
Фрукты	3,3	6,2	11,8	1,3	0,5	0,1	0,5	0,5	0
Овощи	4,8	8,4	26,5	5,4	0,5	0,2	0,1	1,0	0
Всего	35,1								

	Витамины									
	A	Каротиноиды	E	C	Тиамин	Рибофлавин	Ниацин	B_6	Фолаты	B_{12}
Бобовые, орехи, соя	0,1	0,1	5,6	0	4,3	1,5	3,9	3,6	16,1	0
Зерновые продукты	9,0	0,7	4,5	5,6	59,7	40,2	45,7	19,8	37,5	0,1
Фрукты	3,2	6,6	3,6	41,0	3,6	2,3	2,1	9,8	9,5	0
Овощи	36,4	82,2	7,3	47,5	8,8	5,1	10,0	20,7	19,1	0
Всего	48,7	89,6	21,0	94,1						

	Минеральные вещества								
	Ca	P	Mg	Fe	Zn	Cu	K	Na	Se
Бобовые, орехи, соя	4,4	6,1	13,4	7,6	5,5	19,7	9,3	0,3	7,1
Зерновые продукты	4,9	19,1	23,0	53,6	27,9	22,6	9,0	0,8	39,6
Фрукты	2,6	1,9	6,4	2,5	1,2	6,5	11,2	1,8	0,5
Овощи	6,5	7,5	14,0	9,8	6,3	18,6	26,4	27,7	2,5
Всего	18.4								

вых продуктов таких факторов, как степень зрелости в момент сбора урожая, метаболические процессы и способы обращения с сырьем после сбора урожая. Пищевые продукты растительного происхождения в рационе человека обеспечивают организм энергией преимущественно через углеводы. Большинство овощей и фруктов содержат большое количество витаминов, минеральных веществ и пищевых волокон, некоторые из них (типа авокадо и орехов) богаты жирами, а зерновые, семена и орехи являются важным источником белка.

На химический состав съедобных растительных тканей влияет много разных факторов. Генетически обусловленные факторы влияют на возможное содержание тех или иных соединений в различных сортах

растения, а наследственный генетический потенциал определяется корневыми побегами. На химический состав влияют также условия выращивания (климатические условия, температура, освещенность и наличие загрязняющих веществ), агротехнические особенности (тип почвы, поступление питательных веществ и влаги, прополка и плотность посадки), степень созревания конкретного органа на момент сбора урожая, физиологический возраст и степень спелости, а также обращение с собранным сырьем, в том числе способы перевалки, а также время между сбором урожая и моментом потребления.

17.3.1. Основные вещества съедобных растительных тканей

17.3.1.1. Вода

При условии ничем не лимитированного потребления влаги ее содержание в жизнеспособных растительных тканях имеет характерный максимум, ассоциируемый с состоянием полного тургора клеточных компонентов. Вода, как правило, составляет около 80–95% сырой массы плодоовощного сырья и менее 20% сырой массы зерновых и бобовых культур, а также орехов. Сочность овощей и фруктов напрямую связана с высоким содержанием влаги в них, а потери влаги при дыхании приводят к нежелательным изменениям текстуры и ощущениям во рту. Помимо влагопотерь при увядании и соответствующего снижения массы, следует учитывать, что в некоторых видах сырья изменение водного баланса может косвенно вызывать как нежелательные, так и желаемые изменения. О взаимодействии воды с другими химическими соединениями и их роли в физиологии клеток см. главу 2.

17.3.1.2. Углеводы

Вместе с водой углеводы относятся к числу наиболее многочисленных и широко распространенных компонентов пищевых продуктов из растительного сырья. Как правило, около 75% сухого вещества растений — это углеводы, состоящие не только из простых сахаров и полисахаридов, но и из пектиновых веществ и лигнина. В растениях углеводы локализованы в клеточных стенках и во внеклеточном пространстве в пластидах, а также в вакуолях или в цитоплазме. Содержание углеводов в различном растительном сырье широко варьирует — от 2% по сырой массе в некоторых листовых овощах (10–25% в некоторых фруктах, более 30% в крахмалистых овощах), до более чем 60% в некоторых бобовых и зерновых.

Структурный каркас, вкус и пищевая ценность продуктов из растительного сырья во многом обусловлены содержанием в них углеводов. Основными сахарами плодов и овощей являются сахароза, глюкоза и фруктоза. Относительно богаты сахарами десертные фрукты и овощи. К полисахаридам относятся крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза и пектин. Крахмал служит резервным углеводом и в клетке присутствует в виде небольших зерен. Полисахариды являются основными структурными компонентами клеточных стенок и очень важны для текстуры и размягчения пищевых продуктов. «Энергетическими» формами углеводов, накапливающимися в растительных тканях, являются, прежде всего, крахмал (в овощах и зерновых) и растворимые сахара (во фруктах).

С точки зрения качества плодоовощной продукции, после сбора урожая очень важны превращения углеводов. Например, потери сахаров при респираторной активности или преобразование сахара в крахмал, приводят к снижению сладости, и наоборот, преобразование крахмала в сахара при созревании фруктов, дает желаемые сладкие вкус и аромат, а в картофеле при пониженных температурах приводит к нежелательному потемнению при тепловой обработке в ходе производства чипсов, хлопьев или картофеля фри.

17.3.1.2.1. Компоненты клеточной стенки

Основными компонентами клеточной стенки являются целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины и лигнин. Целлюлоза относится к наиболее распространенным соединениям в биосфере, она нерастворима и не усваивается человеком. Гемицеллюлозы — это разнородная группа полисахаридов, содержащих различные виды гексоз и пентоз, а также иногда остаточные количества уроновых кислот. Эти полимеры классифицируют по типу доминирующих остатков сахаров на ксиланы, арабиногалактаны, глюкоманнаны и т. п. Пектин обычно представляет собой остатки α-1,4-связанной галактуроновой кислоты, этерифицированной до различной степени метанолом. Пектины, обнаруживаемые в главной клеточной стенке,

более высокометилированы, чем пектины срединной ламеллы между клетками. Путем взаимодействия карбоксильных групп пектина с кальцием могут образовываться ионные сшивки полимерных цепочек. В очищенном пектине неизбежно содержатся большие количества ковалентно связанных неуроновых сахаров — рамнозы, арабинозы и ксилозы, образующих «волосатые» участки молекулы пектина. Особенно богата пектином альбедо цитрусовых (белая губчатая прослойка межу мякотью и кожурой), в которой его содержится до 50% по сухой массе. Основными источниками промышленно выпускаемого пектина являются яблоки и кожура цитрусовых, причем последняя используется преимущественно как желирующее вещество. Лигнин, присутствующий в составе углеводов клеточной стенки, представляет собой трехмерный полимер, состоящий из фенилпропановых звеньев, например, сиреневого альдегида и ванилина, соединенных алифатическими трехуглеродными боковыми цепями. Лигнификация клеточных стенок, особенно ксилемы и паренхиматозной тканей, обусловливает высокую жесткость и прочность стенки. В клеточной стенке содержатся также небольшие количества структурных белков и ферментов, хотя их зачастую и игнорируют. Лучше всего изученным структурным белком является экстенсин клеточной стенки, не содержащийся в срединной ламелле [15]. Большинство ферментов клеточной стенки представляют собой пероксидазы и гидролазы.

Вещества клеточной стенки являются главными компонентами так называемых пищевых волокон. Они могут снижать биодоступность белка и других нутриентов [65], однако очевидна положительная роль пищевых волокон для здоровья. Структура и химические превращения этих веществ более подробно рассмотрены в главе 3.

Несмотря на большие успехи в области аналитических методов и молекулярной биологии, мы попрежнему не знаем тончайших особенностей строения клеточных стенок, которые позволили бы объяснить размягчение ткани по мере созревания и увеличение ее объема при росте [12]. Центральная зона в срединной ламелле занята пектином (см. рис. 17.5), расположенным между главными клеточными стенками соседних клеток. Ферментативный гидролиз пектина (см. главу 6) может уменьшить межклеточную адгезию и тем самым размягчить ткань. Не созревающие томаты-мутанты [34] и трансгенные томаты с резко сниженным содержанием полигалактуроназы (PG) [14] доказывают, что этот фермент необходим для размягчения тканей на последних стадиях созревания. Одновременно с размягчением многих плодов происходит солюбилизация пектина [68] и высвобождение из клеточных стенок низкомолекулярных уронидов. Кроме того, в таком размягчении большую роль может играть гемицеллюлоза, а взаимодействие пектина с кальцием во многом обусловливает жесткость клеточных стенок [21]. Для повышения твердости переработанных продуктов из растительного сырья, например, нарезанных кружками томатов, довольно часто вносят соли кальция.

Важным компонентом клеточных стенок является целлюлоза, однако о ее структуре в клеточной стенке известно очень немного. Сравнительные данные исследований текстуры овощей и фруктов методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и органолептическими методами позволяют высказать предположение, что относительные хрусткость и жесткость определяются соотношением кристаллической и аморфной целлюлозы в клеточной стенке [44]. Экспрессия генов целлюлазы происходит одновременно с этиленобусловленным размягчением плодов, однако роль расщепления целлюлозы в размягчении плодов еще предстоит подтвердить аналитически [46].

Относительные пропорции содержимого клеточных стенок существенно варьируют у разных видов растений, у разных типов клеток, в зависимости от стадии спелости в период сбора, а также от сроков хранения после сбора. К размягчению приводит гидролиз этих компонентов карбогидразами в ходе созревания и удаление кальция, а лигнификация и приток кальция обусловливают увеличение жесткости.

17.3.1.2.2. Крахмал и другие полисахариды

Основным углеводом растительных тканей, не входящим в состав клеточной стенки, является крахмал — линейный (α-1,4) или разветвленный (α-1,4 и α-1,6) полимер *D*-глюкозы (см. главу 3). В растущем растении амилоза синтезируется из аденозиндифосфоглюкозы (*ADPG,* АДФГ) или уридиндифосфоглюкозы (*UDPG,* УДФГ) ферментом крахмалсинтетазой в органеллах, называемых амилопластами. УДФГ образуется из сахарозы ферментом сахарозо-УФГ-глюкозилтрансферазой и АДФГ, а АДФГ — из глюкозы-1-Р ферментом АДФГ-фосфорилазой. Разветвляющий фермент, называемый *Q*-ферментом, образует в цепях

характерны для овса и ячменя, и их вязкость может стать проблемой при фильтровании сусла в пивоварении. Глюкофруктаны содержатся также в существенных количествах в твердой пшенице сорта «дурум».

Такие полисахариды имеют разветвленную структуру, они водорастворимы и содержат α-*D*-глюкопиранозные (1→2) и β-*D*-фруктофуранозные (1→2 и 6→2) связи.

Из некоторых растений и семян также получают камеди и резиноподобные вещества (в виде древесных экссудатов или экстрактов водорослей, табл. 17.12). Эти углеводы химически относят к гемицеллюлозам, причем некоторые из них, в частности каррагинан, гуммиарабик, камедь карайи, камедь рожкового дерева (КРД), гуаровую камедь, ламинарины и трагакантовую камедь выделяют и используют как технологические добавки в целях стабилизации, эмульгирования, загущения и желирования (см. главу 3).

Таблица 17.12

Некоторые примеры некрахмальных растительных полисахаридов, используемых в виде пищевых добавок

Полисахарид	Источник	Состав
Гуммиарабик	Экссудаты акации	Сложный разветвленный полимер *D*-галактозы, *L*-арабинозы, *L*-рамнозы и *D*-галактуроновой кислоты
КРД	Семена рожкового дерева	β-(1→4)-полиманнозный полимер с одной единицей галактозы через каждые 4–5 единиц маннозы
Альгинаты	Коричневые водоросли	D-маннуроновая кислота с β-(1→4)-связью, или L-глюконовая кислота с α-(1→4)-связью, или сополимер
Каррагинаны	Красные водоросли	Линейный полимер галактозы и сульфатированных молекул галактозы с β-(1→4)- или α (1→3)-связями

17.3.1.2.3. Простые сахара и аналогичные соединения

Содержание сахара в овощах и фруктах варьирует от пренебрежимо малого (в авокадо) до более чем 20% (в зрелых бананах) по сырой массе. Основными сахарами в большинство типов растительного сырья являются сахароза, глюкоза и фруктоза. Как правило, в овощах и фруктах содержится больше редуцирующих сахаров, чем сахарозы, хотя иногда бывает и наоборот. Зачастую в них присутствуют и другие сахара, в частности, ксилоза, манноза, арабиноза, галактоза, мальтоза, сорбоза, октулоза и целлобиоза, и иногда они составляют большую долю общего содержания сахаров. В авокадо, например, содержится значительные количества гептолоз, гептоза, октоза и октулоза, а также высших сахаров. В состав растительных гликозидов, в частности, чеснока, иногда входят разветвленные сахара типа *D*-адиозы (рис. 17.15). В тканях фруктов также содержатся сахарные спирты (альдитолы), особенно сорбитол (рис. 17.15), маннитол и ксилитол. Например, *D*-сорбитол в больших количествах присутствует в плодах растений семейства розоцветных, а в некоторых грибах маннитола содержится больше, чем моносахаридов.

В бобовых часто присутствуют значительные (1–3%) количества раффинозы и стахиозы, содержащих α(1→6)-связи между галактозой и глюкозой. Именно эти олигосахариды являются причиной метеоризма у людей, поскольку в организме человека не образуется α-галактозидаза, необходимая для расщепления этой галактозо-глюкозной связи. В царстве растений обнаружены также пента- и гексагидроксильные циклитолы (циклические сахара). В сахарной свекле миоинозитол (рис. 17.15) присутствует в сочетании с галактозой, а в съедобных семенах — с фосфорной кислотой. Гексафосфорный эфир миоинозитола называется фитиновой или инозитгексафосфорной кислотой, которая образует хелатные комплексы с ионами двухвалентных металлов и снижает биодоступность минеральных веществ многих зерновых и бобовых культур (см. главу 8).

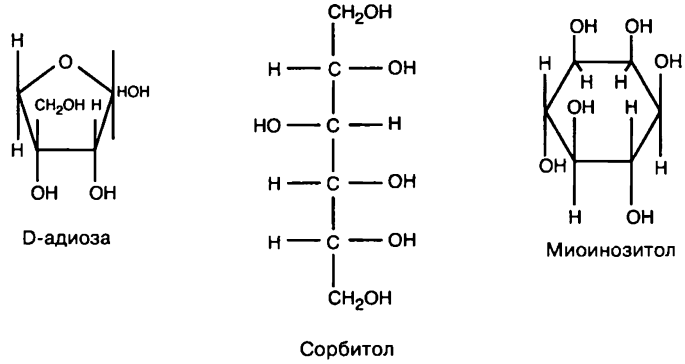


Рис. 17.15. Примеры моносахаридных производных в некоторых растительных тканях

17.3.1.3. Белки и другие азотсодержащие соединения

Состав белков у различных овощей и фруктов сильно варьирует, хотя и составляет лишь небольшую долю их сырой массы. Довольно большое количество белка содержится в некоторых видах растительного сырья, а именно в зерне, бобовых, клубнях и клубнелуковцах (см. табл. 17.11 и 17.13). Белки в растениях в основном обязаны своим существованием ферментам, катализирующим процесса обмена веществ. В ходе разных физиологических процессов (например, при созревании и увядании) образование и активация новых ферментов физиологически важны. Так, в развитие холодовых повреждений может быть вовлечено изменение содержания и активности ферментов вследствие изменения проницаемости клеточных мембран.

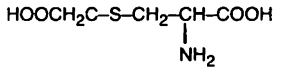
Таблица 17.13
Процентное содержание резервных белков, жиров и углеводов в некоторых видах растительного сырья

Группа соединений	Сельскохозяйственная культура	Белки	Углеводы	Жиры
Высшие углеводы	Пшеница	12	80	2,0
	Кукуруза	12	79	6,5
	Рис	9	82	2,0
	Картофель	9	82	0,4
	Ямс	9	82	1,0
	Кассава	4	85	1,0
Высшие белки	Кормовые бобы	26	57	1,5
	Фасоль	21	58	1,5
	Чечевица	26	56	1,0
	Зеленый горошек	25	70	2,0
	Нут (турецкий горох)	21	71	5,0
Высшие белки и жиры	Арахис	28	15	50
	Рапс (канола)	30	20	40
	Соя	35	25	21
	Семена подсолнечника	35	5	45
	Семена хлопка	0	12	30

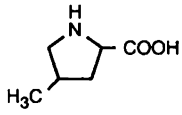
Когда накапливается большое количество белка, его обычно называют «резервным» или «запасным» белком, хотя то, что белки синтезируются растением именно в целях сохранения, является вопросом дискуссионным. Эти вещества могут работать на понижение осмотического давления в пуле аминокислот, связывать аммиак без изменения кислотности *in situ* или служить своего рода макромолекулярным щитом для защиты других соединений от действия ферментов [62]. Независимо от роли резервных белков в физиологии растений или в обмене веществ, для пищевиков они важны прежде всего из-за их вклада в пищевую и энергетическую ценность, а также в функциональные свойства пищевого растительного сырья. Резервные белки растений обычно классифицируют по их растворимости, но такое деление весьма условно. Следует также учитывать, что экстракции и выделению растительных белков может мешать присутствие таннинов и фенольных окисляющихся ферментов. Общим свойством резервных белков семян и клубнеплодов является наличие непептидных амидных связей. Ферментативное деамидирование этих белков может повышать их растворимость, а также улучшать эмульгирующие и пенообразующие свойства [24]. Как правило, молекулярная масса резервных белков растений в ходе их увядания снижается, что обусловлено в основном диссоциацией более крупных комплексов. Кроме того, следует отметить, что резервные белки растений разных сортов одного и того же вида растений обладают разными электрофоретическими свойствами, благодаря чему для идентификации сортов растений неизвестного происхождения можно использовать методы электофореза или изоэлектрического фокусирования («фингерпринтинг»), получая своего рода «отпечатки пальцев» [37].

17.3.1.3.1. Небелковый азот

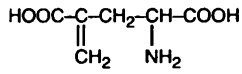
В растительных тканях может содержаться много (20–75%) небелкового азота. Например, более двух третей азота в клубнях картофеля или яблоках может находиться в форме свободных аминокислот или других соединений. В растениях идентифицировано более 60 аминокислот, не обнаруживаемых в белках [8]. Считается, что аминокислоты — это основные источники небелкового азота в большинстве овощей и фруктов, но в растительном сыре может содержаться много других его источников — аминов, пуринов, пиримидинов, нуклеозидов, бетаинов, алкалоидов, порфиринов и аминокислот небелкового происхождения (рис. 17.16). Роль соединений с небелковым азотом в обеспечении качества и изменениях в растительном сырье после сбора урожая еще до конца не ясна, однако некоторые их функции уже известны. Так, свободные аминокислоты участвуют в формировании вкуса овощей и фруктов, повышенное содержание стероидных алкалоидов (соланина и чаконина) в некоторых сортах картофеля придает им горечь и делает ядовитыми, красные пигменты бетанины придают свекле ее цвет, а некоторые аминокислоты и их производные в овощах и фруктах являются важными предшественниками ароматических соединений.



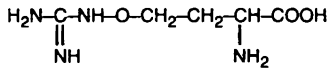
S-(карбоксиметил)цистеин
(в редьке и редиске)



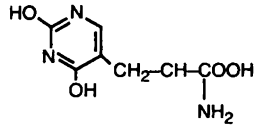
4-метил-*L*-пролин (в яблоках)



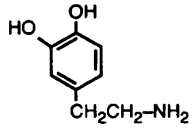
4-метиленглутаминовая кислота
(в арахисе)



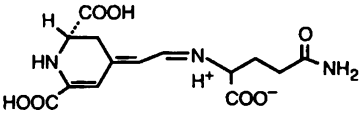
Канаванин (в соевых бобах)



3-(2,6-дигидропиримидин-5-ил)-аланин
(в горохе огородном)



Допамин
(в бананах)



Агликон изобетанидина
(в красной свекле)

Рис. 17.16. Некоторые примеры соединений с небелковым азотом, обнаруженные в съедобных растениях

17.3.1.4. Жиры и жиросодержащие соединения

Растительные жиры преимущественно полярные и в большинстве своем представляют собой фосфолипиды и гликолипиды мембран (табл. 17.14 и рис. 17.17). Жиры составляют менее 1% массы большинства овощей и фруктов по сырой массе (см. табл. 17.10) за исключением тех видов, в которых жиры служат в качестве запаса энергии — например, авокадо (4–20%), оливок (15–40%) и древесных орехов (45–65%). В большинстве сельскохозяйственных культур жиры являются в основном компонентами клеточных

мембран, кутикулы и эпидермиса. С другой стороны, зерновые и бобовые культуры могут накапливать большие запасы полярных липидов, особенно в эндосперме. В соевых бобах содержится до 8% фосфолипидов, а в овсе в общем содержании жиров 8–17% составляют гликолипиды, а 10–20% — фосфолипиды. В овсе содержание полярных липидов выше, чем в других зерновых культурах, так как в эндосперме их семян относительно более высокое содержание липидов в целом. К полярным липидам пшеничной муки (как в крахмальной, так и в некрахмальной фракции) относятся несколько гликолипидов и фосфолипидов (табл. 17.14). Эти гликолипиды играют важную роль для хлебопечения, так как участвуют в формировании клейковины (глютена) [16]. Считается, что крахмально-глютеновую трехмерную сеть в тесте из пшеничной муки стабилизирует именно диацилглицерин дигалактозил [50].

Таблица 17.14
Липидный состав пшеничной муки. По [16]

Липиды	Всего в муке, мг%	В некрахмальной фракции, мг%	В крахмальной фракции, мг%
Триацилглицерины	709	674	35
Диацилглицерины	92	86	6
Свободные жирные кислоты	129	110	19
Стериновые эфиры	90	90	18
Гликолипиды	582	519	63
Этерифицированный моногалактозил ДГи МГ	73	66	7
Этерифицированный стерилгликозид	77	71	6
Моногалактозил ДГ	93	87	6
Моногалактозил МГ	30	23	7
Дигалактозил ДГ	226	214	12
Дигалактозил МГ	83	58	25
Фосфолипиды	1026	242	728
N-Ацилфосфатидилэтаноламин	72	72	
N-Ациллизофосфатидилэтаноламин	34	34	
Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин	19	13	3
Лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилглицерин	69	10	6
Фосфатидилхолин	104	66	38
Лизофосфатидилхолин	693	36	657
Фосфатидилсерин и аналогичные соединения	35	11	24
Всего липидов	2628	1703	925

Обозначения: МГ — моноацилглицерин; ДГ — диацилглицерин.

В качестве показателя зрелости авокадо используется содержание масла, а содержание липидов в кутикуле и эпидермисе важно для внешнего вида большинства видов растительного сырья. Кутикула также важна для защиты от потерь влаги, патогенных микроорганизмов и механических повреждений. Повышение респираторной активности климактерических плодов сопровождается существенным возрастанием содержания фосфатидилхолина и фосфатидиновой кислоты, а на постклимактерической стадии наступает резкое снижение общего содержания липидов вследствие гидролиза и пероксидирования [22].

Мембранные жиры играют также определенную роль при холодовых повреждениях — степень насыщения жирных кислот влияет на текучесть мембраны и может меняться в зависимости от воздействия температур охлаждения. У чувствительных к холоду растений наблюдается тенденция к более высокому содержанию насыщенных жирных кислот, особенно в фосфатидилглицериновом пуле. При температурах охлаждения такие мембраны могут подвергаться фазовым изменениям.

Основным резервным материалом в растительных тканях орехов, масличных семян, бобовых и зерновых служат триацилглицерины нейтральной липидной фракции (см. табл. 17.3 и 17.5). Резервные

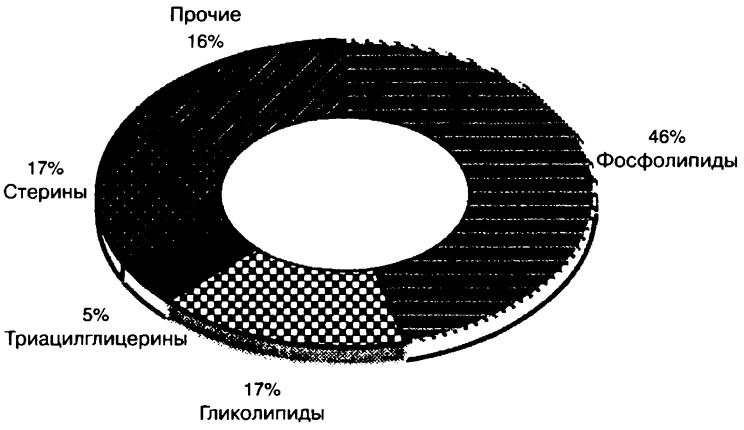


Рис. 17.17. Содержание липидных фракций в мякоти яблок, % от общего содержания липидов

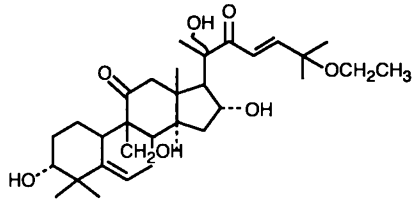
триацилглицерины встречаются преимущественно в виде жировых капель размером менее 10 мкм, локализованных в зародыше и оболочке (в алейроновом слое, окружающем эндосперм) семян. Общее содержание жира в помольных фракциях двух видов зерновых культур приведено в табл. 17.15. В масле из рисовой шелухи содержание нейтральных жиров составляет 85–90%, а в липидах эндосперма риса — 60%. В пшенице нейтральные липиды преобладают в зародыше (80%) и алейроновом слое (72%), тогда как полярные липиды преобладают в некрахмальной (67%) и крахмальной (95%) фракциях эндосперма. Кукурузное масло состоит из 95% триацилглицеринов и 1,5% фосфолипидов, 1,7% свободных жирных кислот и 1,2% стеринов. Основными жирными кислотами липидов зерновых и бобовых являются линолевая ($C_{18:2}$), олеиновая ($C_{18:2}$) и пальмитиновая (C_{16}). Пальмовое и кокосовое масла уникальны по высокому содержанию лауриновой (C_{12}) и миристиновой (C_{14}) кислот, а также содержат пальмитиновую и олеиновую кислоты. В масле какао высока доля стеариновой кислоты, присутствуют также пальмитиновая и олеиновая кислоты. О составе основных жирных кислот в различных растительных маслах см. главу 4.

Таблица 17.15
Общее содержание жира в помольных фракциях риса и пшеницы. По [49]

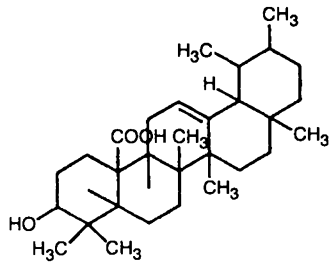
Помольная фракция	Общая доля жира, %
Рис	
Цельное зерно (бурый рис)	2–4
Помол (эндосперм)	<1
Шелуха	15–22
Зародыш	15–24
Полированный рис	9–15
Пшеница	
Цельное зерно	2
Перикарпий	1
Алейроновый слой	9
Крахмальный эндосперм	1
Зародыш	10

17.3.1.4.1. Прочие жиросодержащие соединения

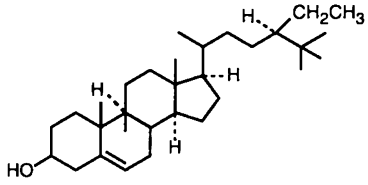
К неомыляемым липидам растительных масел относятся стерины, высшие спирты и углеводороды типа сквалена. В 100 г некоторых свежих фруктов (например, ананаса, дыни-канталупы и апельсина) и овощей (томата, красного перца и моркови) содержится несколько миллиграмм каротиноидов. В растительном сырье накапливаются различные виды каротиноидов (подробнее об этом см. главу 9). В ходе увядания растений распадаются хлоропластные каротиноиды и синтезируются хромопластные. В семенах и мякоти фруктов семейства рутовых (*Rutaceae*) встречаются придающие горечь тритерпеноиды (лимонин), а у семейства тыквенных — кукурбитацины (рис. 17.18). К фитостеринам относят соединения, структурно сходные с холестерином — ситостерин, кампестрол и стигмастерин (рис. 17.18). Для растений одного вида характерно определенное соотношение фито- и других стеринов, что используется для выявления случаев фальсификации растительных масел.



Курбитацин (в огурцах)

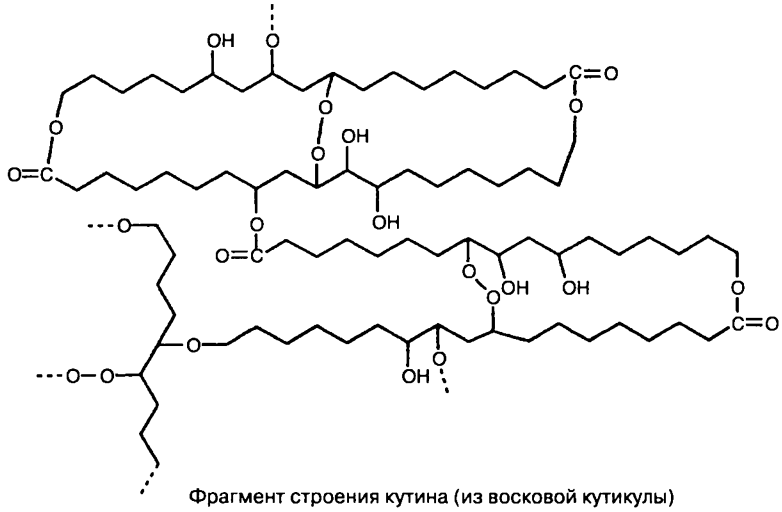


Урсоловая кислота (эпидермальный воск)



Ситостерин (24-α-этилхолестрин), типичный растительный стероид

Рис. 17.18. Примеры тритерпеноидов липидной фракции растений



Фрагмент строения кутина (из восковой кутикулы)

Рис. 17.19. Воскоподобные вещества эпидермальных клеток растений

Липидные компоненты играют важную роль в защите эпидермальных клеток некоторых органов растений. Примеры таких защитных веществ приведены на рис. 17.19. К воскам, предохраняющим поверхность листьев и семян от обезвоживания, относятся высокомолекулярные спирты и жирные кислоты. Восковая кутикула состоит из сложного полимера гидроксильных жирных кислот, называемого кутином.

В формировании характерного вкуса и аромата съедобных растений участвуют и другие липидные или липофильные соединения, присутствующие даже в следовых количествах. Ароматические вещества фруктов — это в основном окисленные соединения (эфиры, спирты, кислоты, альдегиды и кетоны), многие из которых являются производными терпеноидных углеводородов или низших алифатических кислот и спиртов. Спектр таких летучих соединений в овощах обычно уже, чем во фруктах. Иногда эти вещества растворены в терпеноидных углеводородах и локализованы в особых «жировых мешочках» (например, эссенциальные масла в листьях мяты перечной). В других случаях эти соединения образуются в результате декомпартментализации клеток при повреждениях, тепловой обработке или пережевывании растительной ткани.

17.3.1.5. Органические кислоты

Органические кислоты играют важную роль в обмене веществ, в том числе и как запасные соединения в овощах и фруктах. Небольшие количества органических кислот образуются в растениях как промежуточные продукты метаболизма (например, в трикарбоновом цикле, в цикле Кребса, в глиоксилатном цикле или по механизму образования шикимовой кислоты) и могут также накапливаться в вакуолях. Основным путем окисления органических кислот в живых клетках является цикл Кребса, обеспечивающий энергию для поддержания целостности клеток. Именно накопление органических кислот придает кислый вкус, «кислинку». Большинство свежих овощей и фруктов на вкус кислые, причем фрукты обычно кислее овощей. Содержание кислот варьирует от очень низкого (в сладкой кукурузе) до высокого (в смородине,

клюкве или шпинате). В некоторых плодах цитрусовых, например, в лимоне и лайме, содержание кислот составляет 2–3% их сырой массы. На значение pH влияют титруемая кислотность, присутствие специфических органических кислот и их доля, а также другие факторы, оказывающие буферное действие, и значение pH растительного сырья может варьировать от 2 до 7. На 100 г растительной ткани в кислом сырье может содержаться более 50 мэкв кислоты.

17.3.1.5.1. Алифатические кислоты

Наиболее распространенными кислотами в растениях являются лимонная и яблочная (табл. 17.16 и рис. 17.20), каждая из которых составляет до 3% растительной ткани по сырой массе. Примерами случаев, когда доминирующими не являются ни цитрусовая, ни яблочная кислоты, являются виноград и авокадо (в них преобладает уксусная кислота), шпинат (щавелевая) и ежевика (изолимонная). Общая кислотность фруктов по мере созревания обычно снижается из-за участия органических кислот в респираторной активности или превращения их в сахара, но содержание отдельных кислот по мере созревания может и возрастать.

Таблица 17.16
Органические кислоты, преобладающие в конкретных овощах и фруктах

Преобладающая кислота	Овощное и плодово-ягодное сырье
Лимонная	Лимоны, апельсины, смородина, инжир, крыжовник, гуава, логанова ягода (гибрид малины с ежевикой), ананасы, гранаты, малина, земляника (клубника)
	Листовые овощи, бобовые, томаты, картофель, батат
Изолимонная	Ежевика
Яблочная	Яблоки, абрикосы, бананы, вишня, виноград (примерно столько же, сколько и уксусной кислоты), персики, груши, сливы
	Артишоки, капуста-брокколи, морковь, цветная капуста, сельдерей, тыквенные, окра (бамия), репчатый лук
Щавелевая	Шпинат
Хинная	Киви
Уксусная	Авокадо, виноград (примерно столько же, сколько и яблочной кислоты)

17.3.1.5.2. Изоциклические (карбоциклические) кислоты

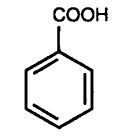
В растительных тканях содержатся также различные ароматические кислоты (см. рис. 17.20). В царстве растений широко распространены алициклические кислоты — хинная (в киви) и шикимовая, которые являются важнейшими промежуточными метаболитами. Некоторые кислоты типа хлорогеновой представляют собой важные компоненты пищевых продуктов, так как они участвуют в реакциях как ферментативного, так и неферментативного потемнения. Феруловая кислота в злаковых культурах участвует в перекрестной сшивке пентозанов (см. рис. 17.14), а кислоты типа бензойной являются важными противогрибковыми соединениями в ягодах, например, в клюкве.

17.3.1.6. Фенольные кислоты

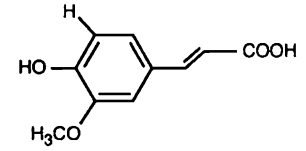
Спектр фенольных соединений в пищевых продуктах растительного происхождения очень широк, как и их функциональные свойства. Традиционно эти соединения считались очень важными из-за их участия в формировании вкуса, аромата и цвета (особенно в ходе ферментативного потемнения, см. главу 6), но в настоящее время они привлекают особое внимание из-за их потенциальной полезности для здоровья [27], актиоксидантной активности ([52]; см. главу 12) и антимикробных свойств [17]. Считается, что фенольные соединения играют определенную роль в защите некоторых незрелых плодов от действия патогенных микроорганизмов.

В простейшем химическом смысле у фенольных соединений имеется гидроксилированное ароматическое кольцо (фенольное, *p*-крезольное или 3-этилфенольное). Такие фенольные кислоты, как кофей-

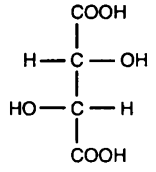
ная, кумаровая и феруловая, часто образуются в метаболизме растительных тканей по пути шикимовой кислоты, начинающегося с конденсации фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата (рис. 17.21). Эти соединения часто присутствуют в виде эфиров сахаров или других фенольных соединений, а также входят в состав таннинов. Так, широко распространенная хлорогеновая кислота — это эфир кофейной и хинной кислот, основной фенольный компонент в яблоках и грушах [61]. По пути образования шикимовой кислоты синтезируются фенилаланин и тирозин, являющиеся важными предшественниками (прекурсорами) образования фенольных кислот, участвующих в повышении биосинтеза лигнина и в процессах ферментативного потемнения.



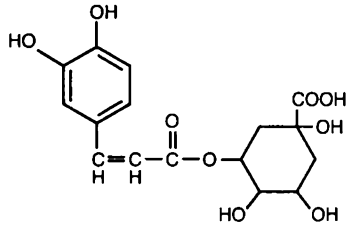
Бензойная кислота (например, в клюкве)



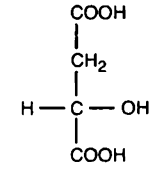
Феруловая кислота (например, в злаковых культурах)



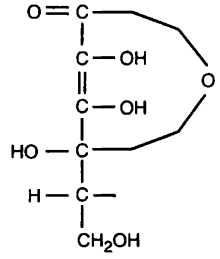
Уксусная кислота (например, в винограде)



Хлорогеновая кислота (например, в грушах)



Яблочная кислота (например, в яблоках)



Аскорбиновая кислота (например, в картофеле)

Рис. 17.20. Структурные формулы некоторых органических кислот, присутствующих в растительных тканях

Большинство фенольных соединений может служить субстратами для процессов ферментативного потемнения; кроме того, они могут вносить свой вклад в потемнение растительного сырья путем образования комплексов с ионами металлов — меди или железа. Для снижения процессов образования этих нежелательных комплексов фенолов с металлами зачастую используют комплексообразователи (секвестранты) типа этилендиаминтетрауксусной кислоты (*EDTA*) или фосфатов. Фенольные соединения являются основными субстратами для проходящих на воздухе реакций ферментативного потемнения в нарезанных или поврежденных яблоках, персиках, картофеле и т. п. Различия в скорости и степени потемнения различных растительных тканей зависят от нескольких факторов, в том числе от доступности субстрата (кислорода или фенолов), активности ферментов, компартментализации ферментов и субстратов, а также от присутствия и доступности ионов металлов. На потемнение конкретной растительной ткани могу влиять и изменения фенольных субстратов в ходе созревания и хранения.

Во фруктах содержание фенолов обычно выше, чем в овощах, причем в незрелых фруктах оно выше, чем в спелых. Для фруктов характерно снижение содержания фенольных соединений по мере созревания и увеличение их содержания как реакция на стрессы — например, на чистку или инфицирование грибами. Глубина и сила этих изменений сильно варьирует в зависимости от вида растительного сырья и условий его хранения. При хранении на воздухе очищенной моркови в ней быстро накапливается *транс*-5'-коффеоилхинная кислота, однако при высоких концентрациях диоксида углерода и низких концентрациях кислорода ее образование ингибируется [3]. Аналогичным образом при хранении измельченного салата-латука в такой газовой среде фенольные соединения в нем накапливаются медленнее [40].

17.3.1.6.1. Таннины (полифенолы)

Полифенолы обычно подразделяют на «конденсированные» и «гидролизуемые», но эти понятия зачастую вносят путаницу, поскольку обе эти группы полифенолов способны к гидролизу. Конденсированные таннины правильнее относить к таннинам, образованным из флаван-3,4-диолов, или к проантоцианидинам, а гидролизуемые таннины — к галло- или эллаготаннинам (рис. 17.22). Полифенолы пищевых продуктов обладают самыми разными функциональными свойствами, формируя цвет и придавая пище терпкость.

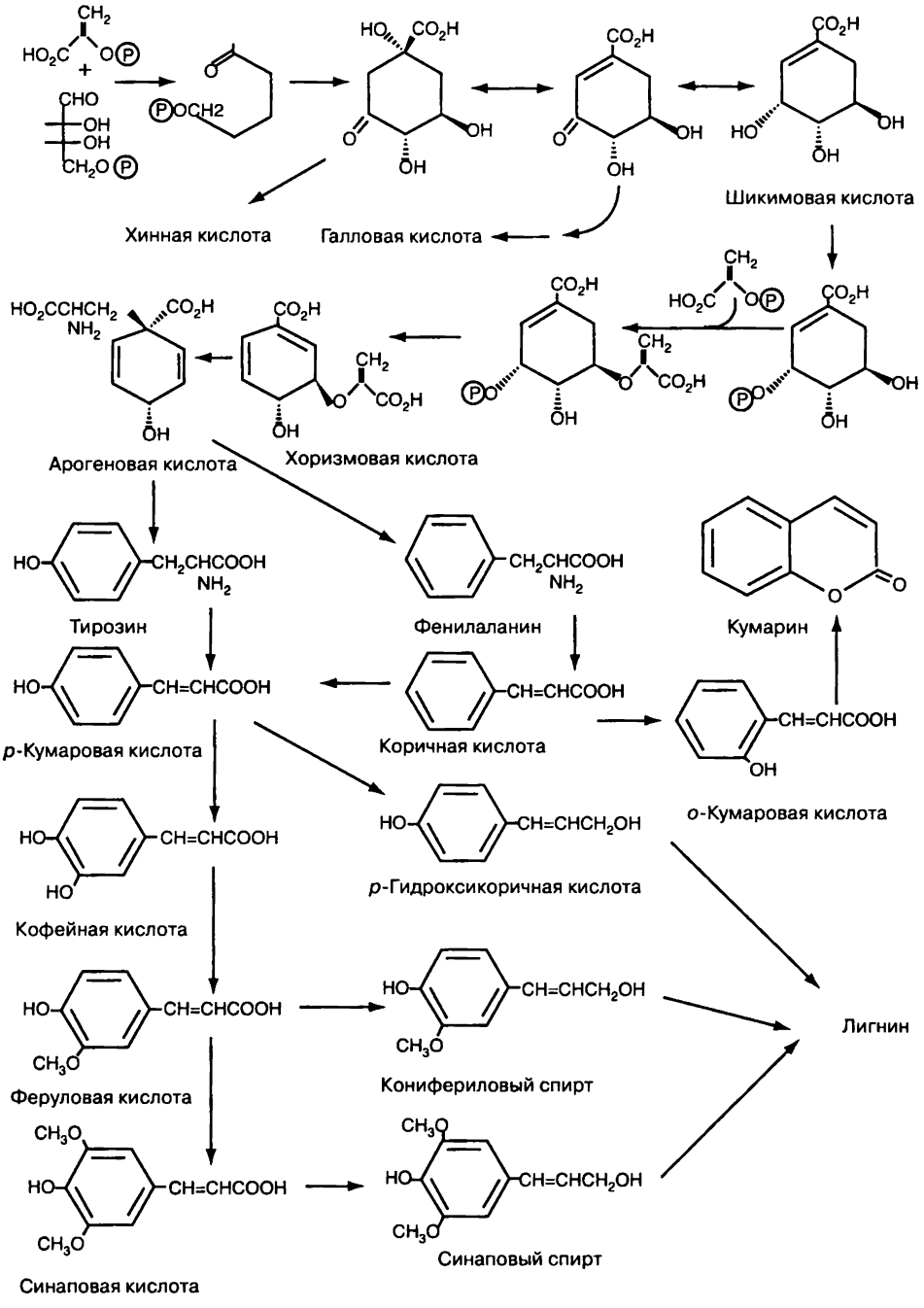


Рис. 17.21. Биосинтез некоторых фенольных кислот (по пути шикимовой кислоты)

Терпкость незрелых («зеленых») фруктов определяется именно содержанием таннинов, которые представляют собой группу соединений с молекулярной массой до 3000 Da, образующихся из карбоциклических и фенольных кислот, а также из сахаров. Точное строение более крупных молекул таннинов до сих пор не известно.

Слово «таннин» восходит к использованию для дубления кож растительных экстрактов (*to tan* — дубить кожу, *англ.*), из-за чего их иногда называют дубильными веществами. В производстве пива, например,

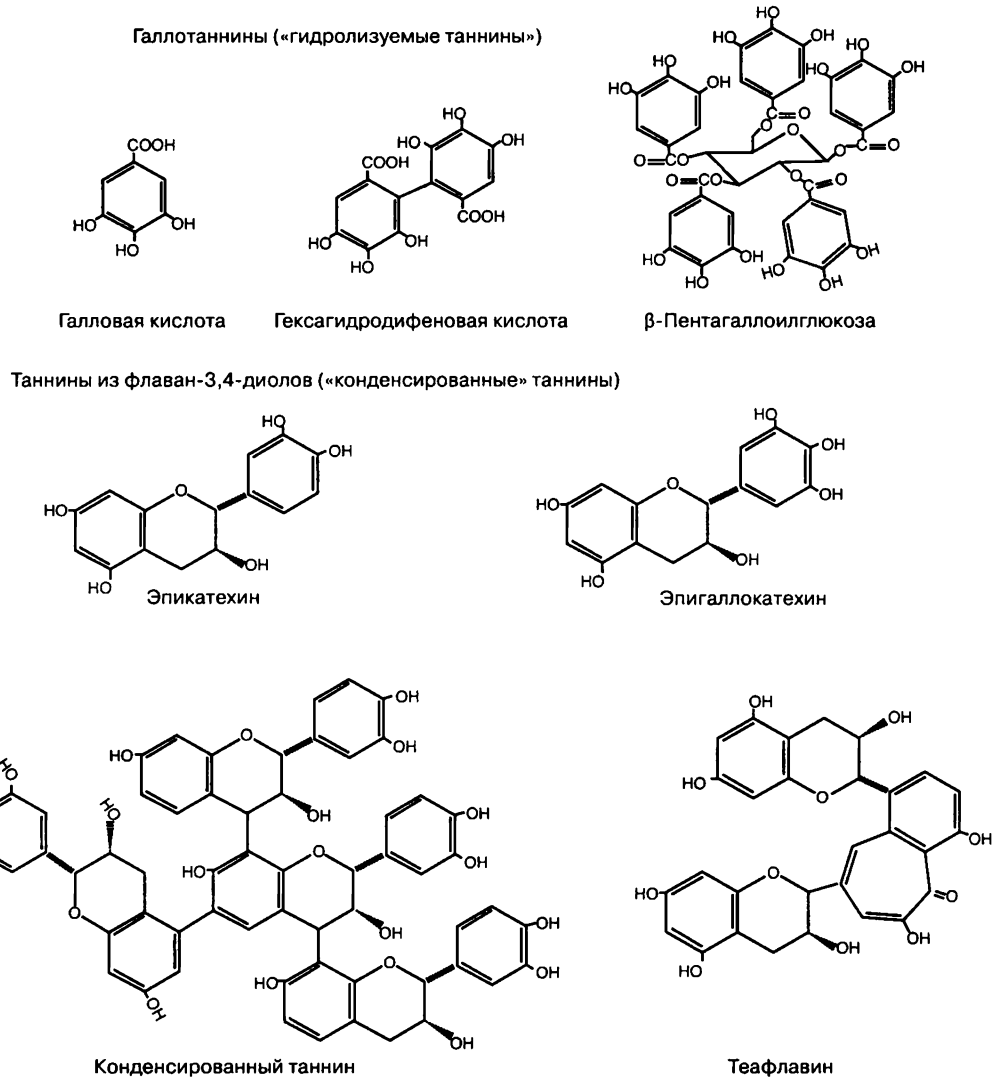


Рис. 17.22. Структурные формулы некоторых таннинов растительных тканей и пищевых продуктов

очень важны взаимодействия таннинов с белками, поскольку таннины из хмеля реагируют с белками, и образуется так называемая «муть». Считалось, что образование комплексов «таннин-белок» снижает нутритивную ценность ткани с высоким содержанием таннинов [57], однако эти «антинутритивные свойства», более вероятно, обусловлены непосредственным физиологическим действием самих таннинов [13]. Таннино-белковые комплексы характеризуются наличием водородных связей и гидрофобными взаимодействиями, так что при окислении фенольных соединений они могут образовывать ковалентные связи с амидными и сульфгидрильными группами [25]. Белки с высоким содержанием пролина обладают более близким сродством к таннинам, чем другие белки. Считается, что терпкость многих фруктов обусловлена именно взаимодействием таннинов с мембранами слизистой оболочки ротовой полости. Кроме того, таннины образуют комплексы с кофеином, что приводит к образованию преципитата, называемого «чайной пенкой» [51]. Для комплексообразования таннинов и снижения терпкости вин можно использовать желатин (из-за его аминокислотного состава). Наиболее потребляемым напитком в мире является чай, и многие его свойства обусловлены содержанием таннинов [4]. При превращении свежесобранных чайных листьев в чай основное внимание уделяют именно контролю окисления полифенолов. В производ-

стве зеленого чая для снижения окисления полифенолов чайные листья вначале бланшируют, тогда при производстве черного чая, наоборот, окисление полифенолов желательно, так что весь технологический процесс направлен на усиление и контроль их ферментативного окисления. Технологическим операциями при этом являются снижение содержания влаги в чайных листьях для концентрирования фенольных соединений (винтеризация) с последующим измельчением листьев, что нарушает компартментализацию клеток и позволяет окисляющим ферментам воздействовать на субстрат. После достижения требуемой степени окисления процесс завершают бланшированием. В производстве чая оолонг (средней степени ферментирования) процесс окисления прерывают вскоре после измельчения чайных листьев.

В свежих зеленых чайных листьях содержится около 40% (по сухой массе) полифенолов, основными из которых являются эпигаллокатехингаллат, эпигаллокатехин и галлокатехин. Окисление катехинов и галлотаннинов с последующим конденсированием приводит к образованию флавинов, обусловливающих красноватый цвет черного чая. Аналогичным образом из эпикатехинов и галловой кислоты образуются эпитеафлавоновые кислоты. Сложную группу полимеризованных процианидинов образуют арубигены, обусловливающие коричневатую окраску чая. В настоящее время большой интерес проявляется к антиоксидантным свойствам полифенолов и их полезности для здоровья (см. главу 12).

17.3.1.7. Красящие вещества

Основные красящие вещества (пигменты) растительных тканей — хлорофиллы, каротиноиды и флавоноиды — рассматриваются в главе 9. На синтез красящих веществ и их распад в отделенных от растения фруктах и овощах влияют условия хранения (воздействие света, температуры, относительной влажности и наличие летучих веществ типа этилена). Этилен образуется в растительных тканях в ходе созревания, после повреждений или при воздействии на растение содержащихся в воздухе загрязнений. Посредством его гормонов этилен инициирует расщепление хлорофилла в зрелых растительных тканях, в частности, во фруктах и листовых овощах. Как правило, в овощах мы желаем этот процесс затормозить (воздействием низких температур или путем хранения в модифицированной газовой среде), во фруктах — ускорить его (например, путем хранения в этиленсодержащей газовой среде). Точный механизм влияния этилена на расщепление хлорофилла до конца не ясен. Хлорофиллаза (*EC* 3.1.1.14) — это гликопротеин тилакоидной мембраны, который катализирует гидролиз фитольной боковой цепи хлорофилла (без изменения цвета), но вполне вероятно, что после гидролиза происходит окислительное разложение тетрапиррола с участием пероксидазы (хлорофилл : H_2O_2 оксидоредуктазы). В растущих растениях и семенах в расщеплении хлорофилла и каротиноидов участвует также изоферменты липоксигеназы [33].

Каротиноиды, придающие желтую, оранжевую и оранжево-красную окраску, являются очень стабильными соединениями, не расщепляющимися даже при довольно сильном увядании. Для пищевой ценности очень важно содержание основного каротиноида — β-каротина (провитамина А). Для развития плодов очень важен синтез каротиноидов, но он может маскироваться хлорофиллом (например, в цитрусовых и бананах). У созревающих томатов синтез каротиноидов происходит параллельно с расщеплением хлорофилла. При созревании фруктов основным метаболическим событием является превращение зеленого хлоропласта в желто-красный. В цитрусовых на это превращение могут влиять перепад дневных и ночных температур (холодные ночи этому превращению хромопластов способствуют), а также соотношение в тканях кожуры азота и сахарозы [28].

Антоцианины (красный, синий и фиолетовый пигменты) являются флавоноидами — водорастворимыми, кислотостойкими гликозидными фенольными соединениями, легко гидролизующимися до свободного антоцианидина и окисляющимися до коричневато-окрашенных веществ. Цвет антоцианов зависит от вакуолярного значения pH. Зачастую они содержатся в эпидермальном клеточном слое фруктов и придают им «румянец».

17.3.1.8. Витамины

Растительные ткани являются важным источником незаменимых для питания человека витаминов. Вклад различных съедобных растительных тканей в потребление витаминов с пищей приведен в табл. 17.11. Содержание витаминов в том или ином виде растений во многом зависит от сорта, условий возделывания

и хранения собранного растительного сырья, а также от способа переработки. Содержание витамина С в шпинате, например, варьирует от 40 до 155 мг/100 г по сырой массе. В семенах масличных культур, особенно в соевых бобах, высоко содержание витамина Е (более 10 мг/100 г по сырой массе). Некоторые овощи и фрукты являются особо богатыми витамином С (гуава, черная смородина, земляника, кормовая капуста) и провитамином А (салат-латук, шпинат и морковь). Зерновые культуры — это хороший источник витаминов B_1, B_2 и B_6.

Витамины распределены по растительным тканям неравномерно. Примером народной мудрости может служить старая присказка «Грех — есть картошку и выбрасывать кожуру», поскольку в кожице корнеплодов концентрация тиамина и аскорбиновой кислоты сравнима с внутренними тканями клубней. Отделение крахмалистого эндосперма от зародыша и алейронового слоя при помоле зерна приводит к существенным потерям витаминов группы В и минеральных веществ.

Водорастворимые витамины фруктов и овощей, особенно аскорбиновая кислота, после сбора урожая при неправильном обращении и хранении очень быстро распадаются. Потери аскорбиновой кислоты можно минимизировать путем осторожного обращения, не причиняя овощам и фруктам повреждений, избегая потерь влаги и длительных задержек охлаждения, а также холодовых повреждений. Снизить потери аскорбиновой кислоты можно также снижением содержания кислорода в газовой среде при хранении. Как правило, послеуборочные потери витаминов группы В и провитаминов А намного меньше и возникают обычно при повышенных температурах в присутствии кислорода.

17.3.1.9. Минеральные вещества

Общее содержание минеральных веществ в растительных тканях иногда выражают показателем зольности (массой остатка после сжигания), который варьирует от менее 0,1% (у ямса) до более 4% по сырой массе (у кольраби). Содержание минеральных веществ зависит от видовых характеристик и применяемых агрономических приемов. Минеральный состав некоторых съедобных растительных тканей приведен в табл. 17.17, а вклад растительного сырья в потребление минеральных веществ с пищей можно увидеть выше в табл. 17.11. К наиболее распространенным минеральным элементам растений относятся калий, кальций, магний, железо, фосфор, сера и азот. Единственным общим для большинства растений распространенным элементом является калий — в петрушке, например, его более 1% по сырой массе. Вторым по распространенности элементом является кальций, который обычно содержится в клеточных стенках и мембранах. Магний является частью молекулы хлорофилла, а фосфор входит в состав белков, важных для метаболизма углеводов и энергопереноса.

Таблица 17.17
Минеральный состав некоторых съедобных растительных тканей

Растительное сырье	Содержание минеральных веществ, мг/100 г (по сырой массе)							
	K	P	Mg	Ca	Na	Fe	Cl	Zn
Бобовые:								
соевые бобы	1400	490	210	210	6	7	6	1
арахис	710	370	160	59	5	2	7	3
Овощи:								
красная свекла	336	46	1	29	86	1		1
томаты	297	26	20	14	6	1	60	
зеленостручковая фасоль	256	37	26	51	2	1	36	
Зерновые:								
пшеница	454	433	183	45				

Мы уже отмечали, что распределение тех или иных минеральных веществ в растительной ткани неравномерно. В горохе фосфора намного больше в семядолях, чем в оболочке семени, а для кальция ситуация прямо противоположная. Минеральные вещества присутствуют в растениях преимущественно в виде со-

лей органических кислот. При хранении овощей и фруктов между физиологически активными центрами (корнем, соцветием, листьями и накапливающими органами) происходит активный обмен минеральными веществами [72].

От минерального состава растений конкретного вида зависят до- и послеуборочные физиологические нарушения. Например, дефицит кальция перед сбором урожая является причиной многих физиологических нарушений, симптомы которых обычно проявляются в ходе послеуборочного хранения, но если в ходе агротехнической обработки или путем послеуборочной подготовки содержание кальция увеличить, то срок хранения и качество продукции существенно повышаются.

17.3.2. Изменения, влияющие на качество продуктов растительного происхождения

Исследования различных изменений соединений, входящих в состав органов растений, в ходе различных стадий их развития очень важны для определения оптимальной, с точки зрения времени сбора, степени зрелости. Такая информация также важна для соотношения органолептических показателей с составом растительного сырья и для разработки средств контроля степени изменений в составе сырья. Физиологические проявления химических изменений на клеточном уровне определяются несколькими факторами — «биологическими часами» и факторами окружающей среды, влияющими на экспрессию генов, метаболическими обратной и прямой связями тех или иный путей обмена веществ, изменениями в компартментализации реагентов, а также ингибированием или активацией катализируемых ферментами реакций. Помимо механизмов регулирования на клеточном уровне, большое влияние на изменения в свежем или переработанном растительном сырье после сбора урожая оказывают такие факторы, как температура, концентрация кислорода, значение pH и целостность тканей. Количественные различия в таких изменениях состава под действием изменений окружающей среды играют большую роль в определении оптимальных условий, обеспечивающих максимально возможное потребительское качество продукции.

Химические изменения, происходящие в овощах и фруктах после сбора урожая, регулируются самыми разными биохимическими механизмами. Простое присутствие того или иного фермента само по себе еще не задает его функциональную роль в некотором физиологическом явлении. Например, в клубнях картофеля присутствует инвертаза, но ее активность иногда ингибируется белковым ингибитором инвертазы. Предшественники вкуса и аромата совсем не обязательно превращаются во вкусоароматические вещества *in situ,* даже несмотря на наличие специфических «флавораз» (ферментов), поскольку эти реагенты могут быть физически отделены друг от друга клеточными микроструктурами. Важность разрушения целостности клетки для биохимических изменений овощей и фруктов невозможно переоценить [58] — такое разрушение особенно влияет на формирование вкуса и аромата, побочных привкусов и запахов, а также на реакции потемнения.

Тонкие различия в составе микрокомпонентов, например, ионов неорганических соединений, могут оказать глубокое влияние на пути метаболизма путем изменения активности конкретных ферментов. Так, ионы кальция влияют на процессы ассоциирования и диссоциирования пероксидазы клеточной стенки и тем самым они лимитируют реакции лигнификации клеточных стенок, катализируемые пероксидазой. Подробнее о факторах регулирования катализируемых ферментами реакций см. главу 6.

17.3.2.1. Изменения компонентов клеточной стенки

Так как основным структурным элементом растительной ткани являются клеточные стенки, они играют центральную роль для сохранения качества текстуры пищевых продуктов. В некоторых случаях, например, у яблок, сельдерея и салата-латука желательна хрусткость, тогда как в других, наоборот, более предпочтительна мягкая текстура (например, у груш, земляники и томатов). Основное влияние на размягчение растительной ткани оказывают происходящие в клеточной стенке изменения. Размягчение может происходить и из-за недостаточного тургора, однако в большинстве овощей и фруктов размягчение тканей является результатом превращений полисахаридов клеточной стенки вследствие их деполимеризации, деметилирования и потери кальция. Отверждение же происходит вследствие образования в клеточной стенке лигнина — примерами могут служить спаржа, сельдерей и груши. У спаржи и сельдерея основными

зонами синтеза лигнина являются клеточные стенки сосудистых тканей, а у груш он происходит прежде всего в клетках семян.

Размягчение обычно сопровождается солюбилизацией пектина и высвобождением полиуронидов. В растениях и грибах широко распространена пектинметилэстераза (*PME*) — фермент, катализирующий удаление из пектина метилового эфира. В зеленых плодах томатов 90% пектина метилировано, и по мере увеличения содержания *PME* в ходе созревания содержание метилированного пектина снижается примерно до 30%. В бананах по мере их созревания содержание *PME* также возрастает, однако в яблоках, гуаве, манго и землянике оно снижается. Фермент эндо-*PG*, который считается более влияющим на структуру пектина, чем экзо-*PG* (см. главу 6), присутствует не во всех плодах и явно отсутствует в яблоках [6], в которых присутствует экзо-*PG*. У большинства плодов содержание *PG* и целлюлазы в ходе созревания возрастает. Несмотря на то что у томатов содержание *PG* и *PME* по мере созревания увеличивается, не только они влияют на наблюдающееся размягчение — важную роль в нем играют также гемицеллюлазы и целлюлазы. Хотя большинство имеющихся сведений касается именно тех изменений в клеточной стенке, которые связаны с ее разрушением, следует отметить, что при этом происходит и определенный синтез веществ [41].

Выход фруктовых соков и других сокосодержащих напитков, их прозрачность и стабильность мути во многом зависят от количества и типов пектоферментов. В цитрусовых и томатном соках, в которых требуется стабильность коллоидной суспензии, присутствие *PME* и *PG* нежелательно. Особенно трудно добиться стабильности мути в цитрусовых соках, поскольку одна из форм *PME* довольно термостойка [73]. Классический метод получения томатного сока с «горячей паузой» основан на инактивации *PME* перед разрушением клеточных стенок, поскольку иначе произойдет существенная деэтерификация пектина. В некоторых технологиях для солюбилизации пектина и повышения выхода растворимых СВ, *PG* вносят дополнительно.

Умеренное нагревание (например, до 60–70 °С) растительных тканей вызывает разрушение клеточных мембран и декомпартментализацию клеточных компонентов. У некоторых овощей (в том числе у картофеля и зеленостручковой фасоли) такое нагревание приводит к упрочнению текстуры. Считается, что такое уплотнение начинается с повреждений клеточных мембран и повышения их проницаемости. Это приводит:

к высвобождению ионов Ca^{2+} (например, из фосфатов крахмала картофеля) и их диффузии в клеточную стенку или в срединную ламеллу;

к активации *PME* и деэтерификации пектина;

к образованию ионных Ca^{2+} (и/или Mg^{2+}) перекрестных сшивок между карбоксильными группами пектина.

Перераспределение ионов Ca^{2+} приводит также к появлению проблем с варкой фасоли и других бобовых, заключающихся в увеличении продолжительности их варки. Считается, что увеличение сроков хранения фасоли и бобов при повышенных температуре и относительной влажности приводит к катализу фитазой превращения фитата кальция в миоинозитол и миграции свободных ионов Ca^{2+} в срединную ламеллу, где образуются перекрестные сшивки. Размягчение консервированных абрикосов обусловлено комплексообразованием кальция из клеточных стенок с помощью органических кислот, особенно лимонной [18].

17.3.2.2. Осахаривание крахмала

Важным процессом обмена веществ в растительном сырье после сбора урожая является синтез крахмала и его расщепление на простые сахара. Снижение вязкости изготовляемых по рецептурам пищевых продуктов, в которых в качестве загустителя использовался крахмал, обусловлено присутствием в растительных тканях расщепляющих крахмал ферментов. В картофеле наличие сахаров нежелательно, поскольку они ухудшают текстуру отварного картофеля, придают ему нежелательную сладость и делают картошку при жарке слишком темной. В большинстве сортов картофеля преобразование крахмала в сахарозу и редуцированные сахара при хранении при температурах охлаждения (положительных, но не выше 5 °С) усиливается в 5–20 раз. Согласно имеющимся данным, при биосинтезе сахарозы, катализируемом сахаразосинта-

зой (рис. 17.23), при низких температурах утилизируются гексозо-6-фосфаты (с помощью фруктозо-6-*P*), которые в противном случае по обратной связи ингибировали бы гликолиз. Глюкозо-6-фосфат — это ингибитор расщепления крахмала, катализируемого фосфорилазой. При температурах хранения выше 10 °С сахароза или, возможно, ее фосфат, действует как лимитирующий фактор гидролиза крахмала по обратной связи контроля фосфорилазы или как промотор синтеза крахмала с помощью АДФ-глюкозо-крахмальной гликозилтрансферазы. В растущих корнеплодах картофеля фосфорилаза катализирует образование α-1,4-гликозидных связей, тогда как в созревших корнеплодах она в основном катализирует расщепление крахмала. Амилазы, играющие большую роль в катаболизме крахмала в прорастающих корнеплодах, в картофеле, находящемся в состоянии покоя, по-видимому, не слишком активны. В корнеплодах картофеля содержится белковый ингибитор фермента инвертазы (рис. 17.23), инактивирующийся при температурах охлаждения (в условиях холодового стресса). Тем самым сахароза частично превращается во фруктозу и глюкозу. Теоретически причиной размягчения некоторых сортов картофеля при холодильном хранении является нехолодостойкость фосфофруктокиназы и, возможно, пируваткиназы [2], «обход» фосфофруктокиназы по пентозофосфатному циклу [69] и потеря зернами крахмала их целостности [5].

В размягчении тканей на холоде играет роль и ингибирование синтеза крахмала при низких температурах. Блокирование экспрессии АДФ-глюкозопирофосфорилазы (АГФ-азы) антисмысловым геном в трансгенном картофеле приводит к прекращению образования крахмала и накоплению сахарозы (30% по сухой массе) [42]. АГФ-аза катализирует образование нуклеотидного сахара, участвующего полиглюкановой цепи синтеза амилозы:

АДФ-глюкозопирофосфорилаза

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} + \text{АТФ} \rightarrow \text{АДФГ} + PP_i$$

АДФГ-крахмалсинтетаза

$$\text{АДФГ} + (\text{Глюкоза})_n \rightarrow (\text{Глюкоза})_{n+1} + \text{АДФ}.$$

Кроме того, блокирование экспрессии АГФ-азы приводит к существенному увеличению мРНК для фермента сахарозофосфатсинтазы.

Независимо от способов накопления сахаров при холодильном хранении растительного сырья, они служат источниками проблем при коммерческом хранении картофеля. На практике эта проблема решается путем «рекондиционирования» (выдерживания картофеля в течение нескольких суток в тепле для снижения содержания сахара путем катаболизма и превращения их в крахмал) или путем удаления избыточного количества сахара при мойке нарезанного картофеля.

У некоторых видов растительного сырья, особенно у физиологически незрелых семян гороха, сладкой кукурузы и зеленостручковой фасоли, после сбора урожая может преобладать не расщепление, а синтез крахмала. Наиболее оптимально синтез крахмала протекает при температурах выше комнатной. У таких видов сырья синтез крахмала сопровождается снижением содержания сахаров и обычно ухудшением качества. Например, сахароза может служить субстратом для сахарных нуклеотидов, участвующих в синтезе крахмала:

Сахарозо-УДФГ-глюкозилтрансфераза

$$\text{Сахароза} + \text{УДФ} \rightarrow \text{УДФ-глюкоза} + \text{фруктозо-1-фосфат}$$

Фосфоглюкоизмомераза, фосфоглюкомитаза

$$\text{Фруктозо-1-фосфат} \rightarrow\rightarrow \text{Глюкозо-1-фосфат}$$

АДФГ-пирофосфорилаза

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} + \text{АТФ} \rightarrow \text{АДФГ} + PP_i.$$

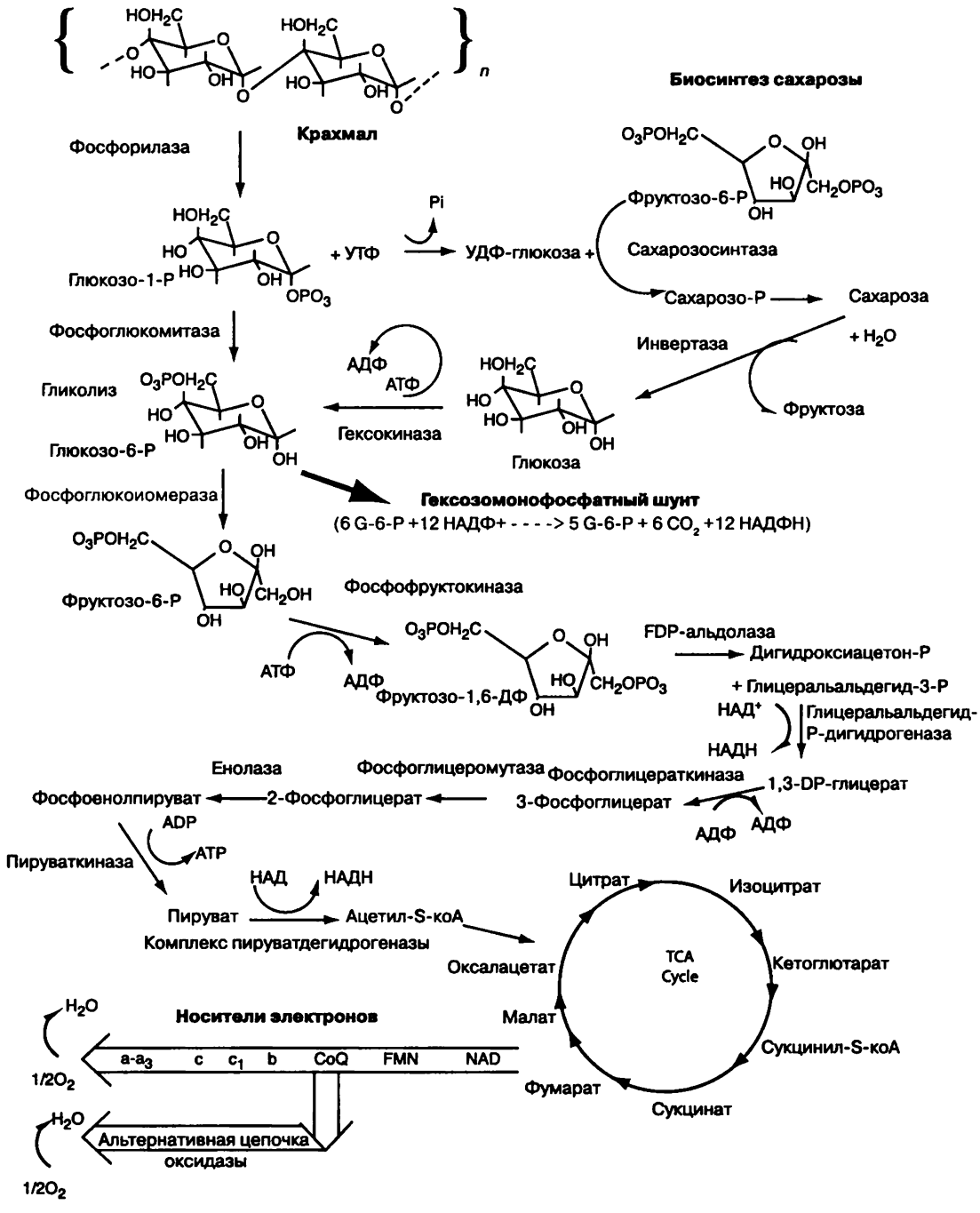


Рис. 17.23. Дыхательный метаболизм крахмала и сахарозы в растениях. По гликолитическому пути 1 моль глюкозы или глюкозо-1-фосфата превращается в 2 моля пирувата. Гексозо-монофосфатный шунт редуцирует 12 молей НАДФ путем окисления 1 моля глюкозо-6-фосфата до диоксида углерода. По циклу трикарбоновых кислот пируват превращается в диоксид углерода с образованием АТФ, НАДФ и метилентетрагидрофолатредуктазы ($FADH_2$). Система транспорта электронов связывает между собой окисление НАДФН и $FADH_2$ с редуцированием молекулярного кислорода до воды и синтезом АТФ из АДФ и P_i на трех сайтах фосфорилирования. От этой системы транспорта электронов на убихиноне (*CoQ*) отходит альтернативная система транспорта электронов, которая не участвует в оксилительном фосфорилировании АДФ в АТФ

Основными ферментами в синтезе крахмала являются те, что присутствуют в тканях, ответственных за фотосинтез, а именно фруктозотрансгликолидаза, АДФГ: крахмал-гликозилтрансфераза, УДФГ-пирофосфорилаза, сахарозо-УДФГ-глюкозилтрансфераза и АДФГ-пирофосфорилаза. Последний фермент ингибируется пирофосфатами, и иногда эти вещества распыляют на сладкую кукурузу для задержки превращения сахаров в крахмал [1]. Снижение содержания сахаров может быть также обусловлено их окислением через опосредованные митохондриями реакции, однако полностью все детали синтеза крахмала в растительном сырье после сбора урожая еще недостаточно изучены.

17.3.2.3. Метаболизм органических кислот

Органические кислоты в растительных тканях после сбора урожая находятся в стабильно жидком состоянии, и их содержание по мере увядания постепенно снижается. Большая часть этих потерь связана с их окислением в процессе респираторного обмена веществ из-за увеличения коэффициента респирации *RQ* (см. раздел 17.2.2). Когда субстратом являются сахара, *RQ* примерно равен 1,0, когда субстратом являются малаты или цитраты он возрастает до 1,3, а когда субстратом служат тартраты, то он увеличивается до 1,6. Некоторые предполагаемые пути метаболизма, связанные с респираторным метаболизмом органических кислот, показаны на рис. 17.24. При климактерическом дыхании некоторых плодов содержание определенных ферментов (например, фермента яблочной кислоты и пируватдекарбоксилазы) и коэффициент респирации *RQ* возрастают параллельно.

Важность метаболизма ароматических органических кислот по пути шикимовой кислоты (рис. 17.25) обусловлена тем, что он связан с белковым обменом веществ, накоплением предшественников ферментативного потемнения (например, хлорогеновой кислоты) и отложением лигнина (фенилпропановых остатков). Следует также отметить, что в синтезе фенольных соединений, липидов и летучих ароматических веществ участвует кофермент А (ацетил-коА). Помимо их важности для формирования вкуса и аромата, текстуры и цвета, некоторые органические кислоты могут модифицировать растительные гормоны и тем самым вовлечены в управление онтогенными изменениями. Так, например, тот факт, что хлорогеновая кислота модифицирует деятельность индол-3-уксусной кислоты, можно увязать с увеличением ее концентрации в зеленых пятнах у дефектных томатов. Органические кислоты иногда участвуют в биосинтезе вкусоароматических соединений в овощах и фруктах. Например, образование изоамилового спирта и глутаминовой кислоты в созревающих томатах связано с работой фермента *L*-лейцин:2-кетоглутаратаминотрансферазой (рис. 17.26).

17.3.2.4. Метаболизм жиров

Несмотря на то что в большинстве овощей и фруктов липидные компоненты присутствуют в относительно небольших количествах, их метаболизм имеет большое значение при хранение растительного сырья после сбора урожая, особенно в неидеальных условиях транспортировки и переработки. Для онтогенеза важны также изменения мембранных липидов как реакция на стресс, созревание и увядание [35]. Процессы старения растительных тканей обусловлены снижением содержания полиненасыщенных жирных кислот, сопровождающимся автолизом мембран и нарушением целостности клеток [38]. Фосфатидил-линолеоиловые (-линолеоиловые) последовательности реакций в растениях приводят также к образованию простагландин-подобного вещества — жасмоновой кислоты. Образующиеся при окислении липидов свободные радикалы действуют как чувствительные субклеточные сайты и, похоже, что они играют важную роль в нормальном развитии растения [74]. Свободные радикалы сразу захватываются их поглотителями типа супероксид, витаминами С и Е, цитокинами, каталазой и глутатионпероксидазой. Известно, что в метаболизме растений после сбора урожая участвуют и окислительные ферменты — липоксигеназа, гидропероксидлиазы, а также гидролитические ферменты типа липазы и фосфолипазы. У овощей и фруктов гидропероксидлиазы расщепляют специфические гидропероксиды с образованием летучих ароматических C_6- и C_9-альдегидов и других продуктов реакций. К вкусоароматическим соединениям, образующимся в поврежденных и увядающих растительных тканях по липоксигеназному пути, относятся *t*,6-*цис*-нонадиеналь (в огурцах), 9-гидрокси-*t*-10,*цис*-12-октадекадиеновая кислота (в овсе) и *цис*-3-гексеналь и прочие соединения (в томатах). В неподвергнутых тепловой обработке растительных тканях

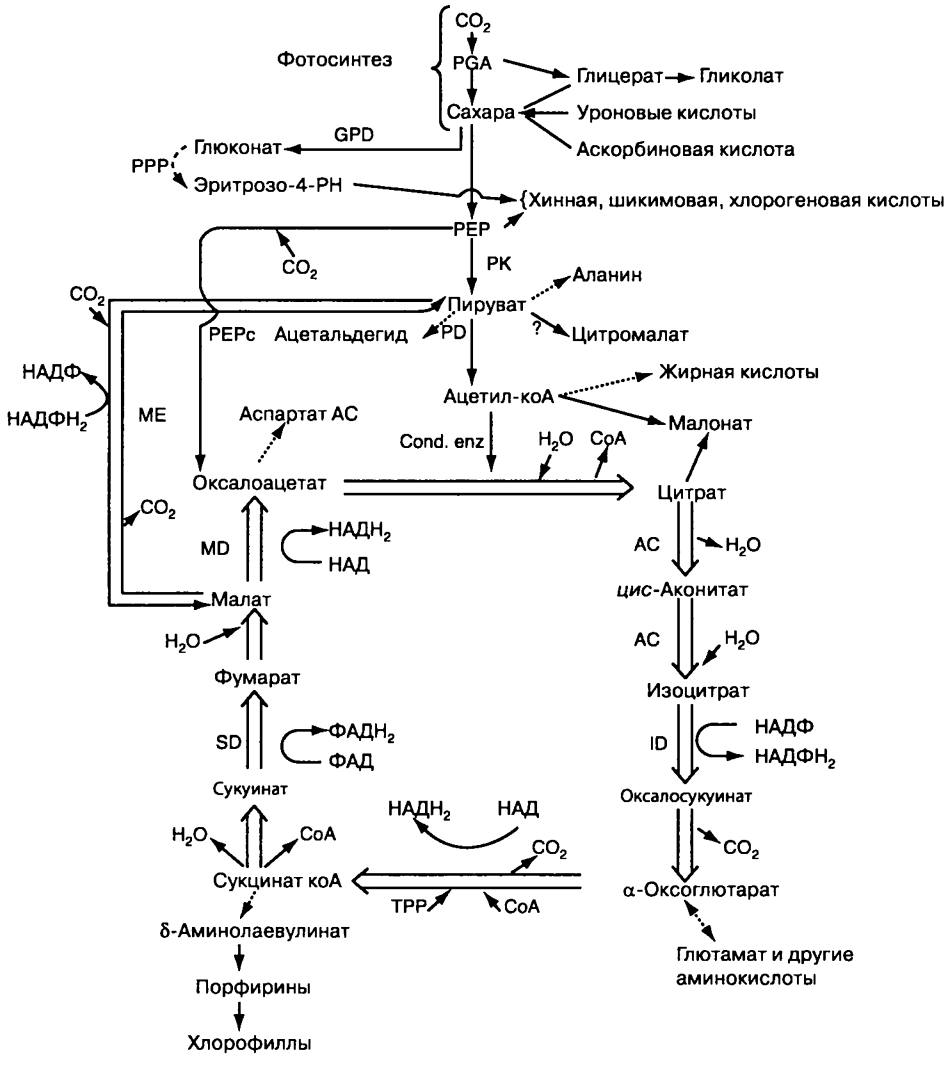


Рис. 17.24. Цикл Кребса (=>) и некоторые другие пути синтеза органических кислот (→) и прочих важных компонентов (→). Обозначения: АС — аконитаза; Cond. enz. — конденсирующий фермент; GPD — глюкозофосфатдегидрогеназа; ID — изоцитрусовая дегидрогеназа; MD — малатдегидрогеназа; ME — фермент яблочной кислоты*; PEPc — фосфоенолпируваткарбоксилаза; PGA — фосфоглицериновая кислота; PD — пируватдекарбоксилаза; PK — пируваткиназа; PPP — путь образования пентозофосфата; SD — дегидрогеназа янтарной кислоты; TPP — тиаминпирофосфат. По [9]

* *Malic enzyme* — кф 1.1.1.4, фермент, катализирующий в цикле трикарбоновых кислот превращение *L*-малата в пируват (пировиноградную кислоту). — *Примеч. перев.*

липоксигеназы активируются при замораживании и дегидратации, что приводит к развитию побочных привкусов и запахов. Образованные при участии липоксигеназ, гидропероксиды могут вступать в реакции с другими компонентами растительных тканей (в частности, с белками), что приводит к обесцвечиванию каротиноидов и хлорофиллов.

Запасные жиры (например, в плодах пальмы, оливках и авокадо) по сравнению с жирами, являющимися частью функциональной клеточной сети, характеризуются совершенно иным составом. Ферментативный гидролиз триацилглицеринов в собранных семенах масличных культур во многом определяет их качество. По сравнению с другими зерновыми культурами особенно высоко содержание липазы в овсе, где она совместно с липоксигеназой участвует в образовании соединений с горьким привкусом (рис. 17.27).

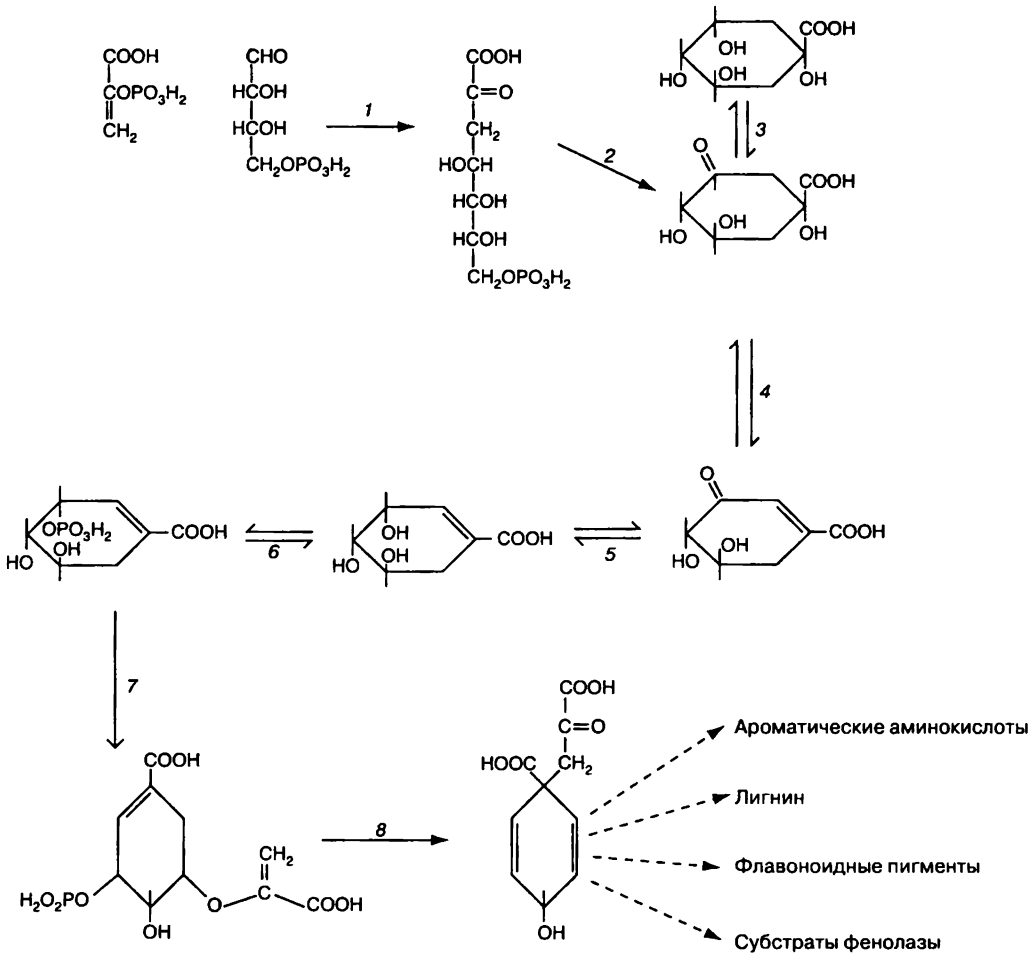


Рис. 17.25. Биосинтез некоторых важных клеточных компонентов по пути образования шикимовой кислоты: *1* — превращение фосфоенолпирувата + *D*-эритрозо-4-фосфата в 7-фосфат 3-деокси-*D*-арабиногептулозовой кислоты; *2* — в 5-дегидрохинную кислоту; *3* — в хинную кислоту; *4* — в 5-дегидрошикимовую кислоту; *5* — в шикимовую кислоту; *6* — в 5-фосфошикимовую кислоту; *7* — в 3-енолпируватэфир фосфошикимовой кислоты; *8* — в префеновую кислоту. О роли этого пути в образовании фенольных компонентов см. рис. 17.21

17.3.2.5. Метаболизм красящих веществ

Во многих съедобных растительных тканях происходит расширенный биосинтез каротиноидов и соответствующих терпеноидов. Их биосинтез осуществляется через универсальную систему продуцирования изопреновых соединений и включает образование из ацетил-коА мевалоновой (3-метил-3,5-диоксивалериановой) кислоты. Большинство каротиноидов состоят из восьми изопреновых единиц (C_{40}). В отделенных от растения частях происходит и биосинтез, и катаболизм, на которые могут влиять условия хранения — концентрация кислорода в газовой среде, действие света и температура. На метаболизм каротиноидов влияют гормональные факторы (этилен и абсцизовая кислота). В некоторых фруктах, в частности в мандаринах, накапливаются большие количества апокаротиноидов (C_{30}). Наиболее распространенными катализаторами расщепления каротиноидов являются липоксигеназы (опосредованно через окисление липидов) и пероксидазы (скорее всего, через вторичные реакции).

Путь синтеза основных C_6:C_3-структур с А-фенильным кольцом флавоноидов был представлен на рис. 17.25. О реакциях образования специфических флавоноидных пигментов известно довольно мало. Синтез антоцианинов, относящихся к красящим веществам флавоноидной природы, наблюдается в ор-

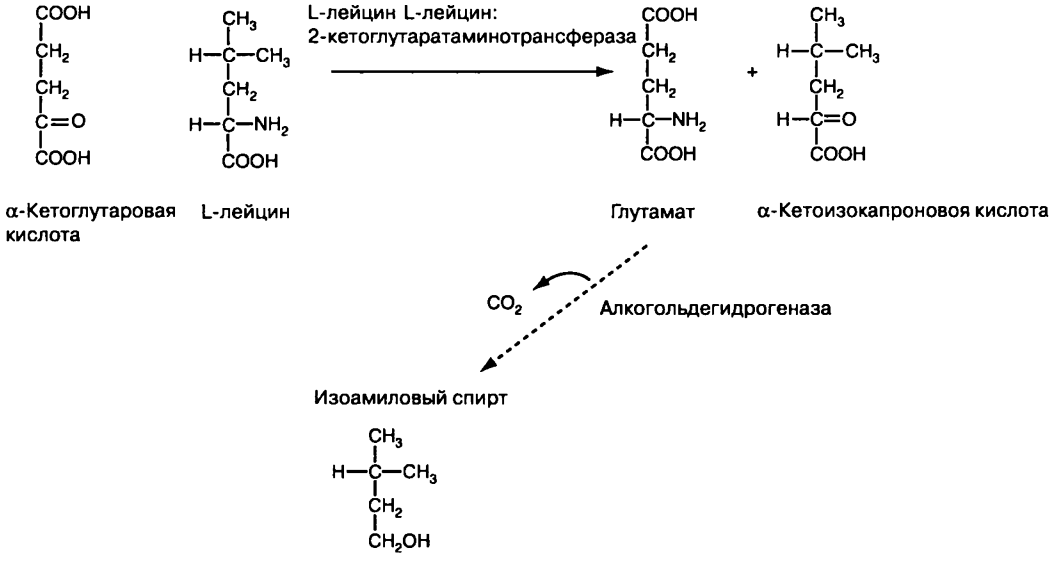


Рис. 17.26. Биосинтез вкусоароматических соединений томатов из органической и аминокислоты

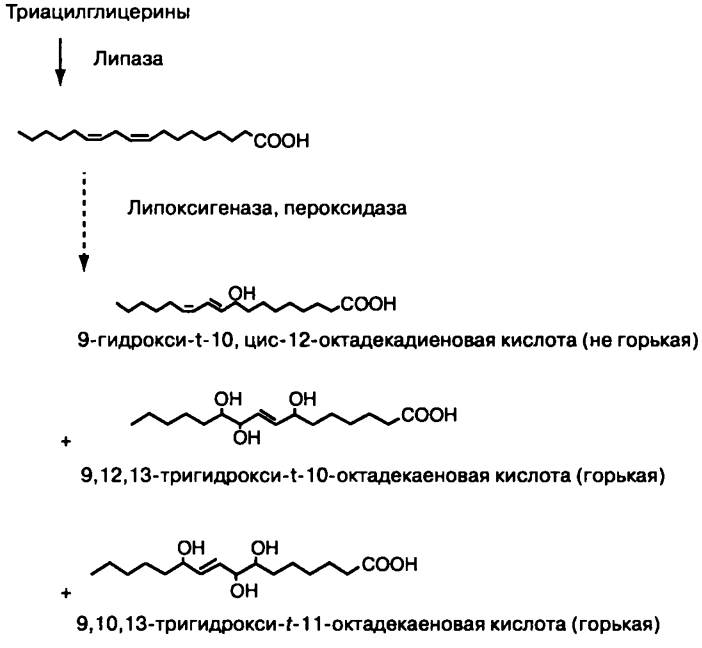


Рис. 17.27. Образование горьких тригидрокси-жирных кислот из триацилглицеринов при переработке овса

ганах растений после сбора урожая и стимулируется действием света и температуры. Багровый цвет краснокочанной капусты развивается и сгущается при хранении капусты при температурах ниже 10 °С. Послеуборочные мероприятия, в том числе опрыскивание N-диметиламиноянтарной кислотой, может инициировать у некоторых видов сырья раннее образование антоцианинов.

Катаболизм антоцианиновых красящих веществ *in situ* до конца не ясен. В переработанных пищевых продуктах (например, при хранении замороженных небланшированных тканей) антоцианины могут сокисляться продуктами расщепления полифенолоксидазой или пероксидазой фенольных соединений.

Обесцвечивание антоцианинов обычно происходит после дегликозилирования, катализируемого эндогенными или грибковыми гликозидазами, которые называют антоцианазами.

Одним из наиболее очевидных изменений в увядающих растительных тканях, содержащих хлорофилл, является утрата характерного зеленого цвета. Зачастую потеря зеленой окраски кожурой, а иногда и мякотью, связана также с созреванием большинства плодов, а «пожелтение» — это свойство увядающих тканей стебля и листьев овощей (см. рис. 17.9). Расщепление хлорофилла *in situ* сопровождается синтезом в отделенных от растения тканях других красящих веществ. Катаболизм хлорофилла во многом обусловлен факторами окружающей среды — светом, температурой и влажностью, причем на разные ткани они могут влиять по-своему. Например, свет ускоряет распад хлорофилла в созревающих томатах и способствует образованию красящих веществ в корнеплодах картофеля.

В живых растительных тканях распад хлорофилла зачастую ускоряется внесением гормонального этилена в количестве нескольких мг/кг. Хранение в этиленсодержащей среде стало обычной практикой применения этого принципа в целях снижения интенсивности зеленой окраски цитрусовых и созревания бананов и авокадо. Наличие хлорофиллазы в растительных тканях приводит к образованию эндогенного этилена, однако взаимосвязь между действием хлорофиллазы и утратой зеленой окраски еще не ясна. Хлорофиллаза представляет собой гидролитический фермент, преобразующий хлорофиллы *a* и *b* в соответствующие хлорофиллиды. Имеющиеся данные свидетельствуют, что хлорофиллаза не катализирует в увядающих растительных тканях начальную стадию распада хлорофилла. Считается, что для начала этого процесса требуется молекулярный кислород, а на более поздних стадиях происходит устранение фитольной боковой цепи. Известно, что в увядающих растениях и замороженных овощах в потерях хлорофилла косвенно участвуют липоксигеназа и пероксидаза. Превращение хлорофилла в феофитин катализируется кислотой, и эта реакция очень важна для пищевых продуктов, подвергаемых тепловой обработке. Вместе с тем она имеет место и в овощах, хранящихся в газовой среде с повышенным содержанием диоксида углерода.

Несмотря на то что ферментативное потемнение в некоторых технологиях является желательным (например, при ферментации чая и какао-бобов, при сушке фиников), оно приводит к обесцвечиванию других видов тканей при их нарезке, растирании, заболеваниях, замораживании и других способах разрушения клеточной структуры. К субстратам этих реакций относятся простые фенолы (например, катехол и галловая кислота), производные коричной кислоты (например, хлорогеновая кислота и допамин), а также флавоноиды (катехин и эпикатехин) — подробнее о них см. главу 6. Подверженность данной ткани потемнению во многом обусловлена сортовой принадлежностью и зависит от содержания фермента, а иногда от видов и количества имеющихся фенольных субстратов. Переработчиками пищевых продуктов для минимизации этой реакции используются удаление кислорода из газовой среды, внесение подкислителей, инактивация нагреванием (бланширование), а также внесение ингибиторов, в частности, сульфитов.

17.3.2.6. Биогенез и распад ароматических соединений

Характерный вкус и аромат овощей и фруктов определяется сложным спектром органических соединений, образующихся в ходе созревания и увядания, а также иногда в ходе переработки или вследствие повреждений. Общее количество вовлеченного углерода при этом составляет менее 1% от доступного углерода в виде CO_2. Ароматические соединения фруктов и овощей обычно представляют собой сложную смесь эфиров, альдегидов, кетонов, терпенов и др. (см. главу 10). Вкус и аромат земляники, например, определяется более чем 300 летучими соединениями. Обычно для конкретного вкуса и аромата данного растительного сырья важны лишь несколько ключевых летучих соединений. У некоторых овощей и фруктов характерный вкус и аромат задаются одним соединением или классом соединений, как, например, 2,6-нонадиеналем в огурцах, амилацетатом в бананах, сульфидами в репчатом луке и фталидами в сельдерее. Биосинтез вкусоароматических соединений овощей и фруктов протекает путем различных реакций, включая метаболизм ароматических и серосодержащих соединений (см., например, рис. 17.26), углеводов и их производных (рис. 17.28), а также ненасыщенных жирных кислот (см. рис. 17.27).

В некоторых растительных тканях, например у растений рода луковых (*Allium*) или семейства крестоцветных (*Cruciferae*), или капустных (*Brassicaceae*), соединения-предшественники вкуса и аромата пре-

вращаются во вкусоароматические соединения ферментативным путем при повреждении клеток в ходе пережевывания или при иных механических повреждениях. Так, был выдан патент на внесение непосредственно перед употреблением в пищу в переработанные пищевые продукты ферментов, усиливающих вкус и аромат. Это делается для восстановления свежего вкуса и аромата, утраченного при тепловой обработке или дегидратации. В этом способе использован тот факт, что молекулы соединения-предшественника могут выдерживать режимы переработки, тогда как ферменты и вкусоароматические соединения зачастую разрушаются. Последовательность реакций с участием липоксигеназы обусловливает образование травянистого, арбузного и других подобных ароматов «зелени». Диапазон формирующих вкусов и запахов зависит от вида растительного сырья и типа жирных кислот, а также от региоспецифичности липоксигеназ, гидропероксидлиаз и/или пероксидаз (см. разделы 17.3.2.4 и рис. 17.27). Кроме того, присутствие предшественников вкуса и аромата и их превращение во вкусоароматические соединения во многом влияет на характерный вкус и аромат, возникающий в ходе переработки и кулинарной обработки разными способами (об этом см. также главу 10).

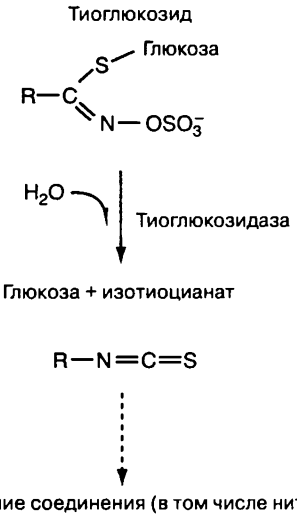


Рис. 17.28. Биосинтез горчичных масел, обладающих едким запахом и вкусом, характерным для растений семейства крестоцветных (капустных) (см. табл. 17.2)

17.4. Обеспечение качества и увеличение срока хранения растительного сырья

17.4.1. Степень зрелости и стандарты качества

Высококачественная плодоовощная продукция должна обладать наивысшими возможными характерными свойствами. Понятие «качество» применимо к самым разным свойствам растительного сырья, в том числе к его внешнему виду, запаху, вкусу, содержанию нутриентов, текстуре, отсутствию химических или биологических примесей и т. п. Значение каждого конкретного аспекта меняется в зависимости от вида сырья. Например, у свежих фруктов и овощей большое внимание уделяется их внешнему виду и запаху, у сырья, используемого для оформления блюд, огромную роль играет их визуальное качество, а у переработанных овощей и фруктов — вкус и аромат. Чаще всего для большинства видов растительного сырья на первом месте стоит внешний вид, хотя иногда он никак не связан с качеством внутренней части продукта (вкусом, содержанием нутриентов и т. п.). Вместе с тем, если по каким-либо причинам растительное сырье становится опасным для здоровья (например, обсемененным патогенными для человека микроорганизмами), продукт незамедлительно снимают с реализации независимо от других показателей качества.

Стандарты сортности скоропортящихся продуктов образуют критерии, по которым определяют уровень качества сырья для участников логистической цепи. Помимо того, что они создают единый «язык» для продавцов и покупателей, стандарты сортности позволяют предъявлять претензии и определять ценовую политику для аналогичного товара сопоставимого качества. Несмотря на то что стандарты сортности в США зачастую назначаются достаточно произвольно, аналогичные стандарты в отдельных штатах и регионах, а также требования к минимальной степени зрелости в торговой сети определяют минимальные стандарты качества, контролируемые Министерством сельского хозяйства или уполномоченным им на то органом. Отдельные заказчики могут предъявлять еще более высокие требования, которые конкретно оговариваются между поставщиком и заказчиком.

Составной частью качества является степень зрелости. Созревшее плодоовощное сырье — это такая продукция, которая после сбора урожая удовлетворяет минимальным стандартам приемлемости плюс прошла соответствующую подготовку (например, дозаривание). Оптимальная степень зрелости неклимактерических овощей и фруктов обычно соответствует оптимальным потребительским свойствам. Не-

которым исключением здесь является батат, потребительские свойства которого улучшаются после посола. У климактерических овощей и фруктов взаимосвязь между степенью зрелости и качеством сложнее, и наилучшее потребительское качество формируется после дозаривания. Вместе с тем конечное качество климактерических фруктов по-прежнему определяется периодом сбора, когда нарушается образование в них эссенциальных веществ (например, сахаров). Слишком ранний сбор может привести к дефициту у плодов внутренних ресурсов для дозаривания до приемлемого качества. Большинство климактерических плодов достигают оптимальных потребительских свойств при созревании непосредственно на растении (например, на ветке или лозе). Решение о времени сбора всегда представляет собой некоторый компромисс между наилучшими потребительскими свойствами и лежкоспособностью растительного сырья на протяжении всей логистической цепи — стоит собрать урожай слишком рано, и плоды никогда не достигнут необходимых потребительских свойств, а если собрать его слишком поздно, то плоды станут слишком мягкими и не переживут хранение и транспортировку.

При сборе урожая различают два вида зрелости растительного сырья. Физиологическая зрелость — это такой этап развития, когда растение или его часть достигнет нормальной стадии «старости» даже в отделенном виде. Например, зеленые плоды томатов являются физиологически зрелыми и могут созреть (покраснеть) даже после их снятия с ветки. Товарная зрелость (иногда ее называют торговой) — это стадия развития, когда растение или его часть обладает требуемыми для потребителя свойствами (например, физиологически созревшие красные томаты или физиологически не созревшие соцветия капусты-брокколи). Многие виды плодоовощного сырья собирают физиологически не созревшими, в том числе огурцы и капусту-брокколи.

Первым шагом к поставке высококачественной плодоовощной продукции является правильное определение времени сбора. Достижение соответствующей степени зрелости при сборе урожая очень важно, поскольку именно на этой стадии съедобные части растения характеризуются оптимальным потенциалом качества, которое после сбора может только снижаться. Соответствующая степень зрелости при сборе урожая во многом определяется видом растительного сырья и целями его дальнейшего использования. Например, многие косточковые фрукты достигают своих наилучших потребительских свойств, когда они полностью вызревают на дереве, однако груши (тоже косточковые) при полном вызревании на дереве приобретают слишком мучнистую текстуру. Зеленые зрелые томаты тверже и лучше справляются со стрессами и нагрузками при транспортировке, тогда как красные, полностью вызревшие томаты мягче и легче в переработке.

Во всех коммерческих операциях жизненно необходимо уметь прогнозировать, когда растительное сырье достигнет оптимальной для сбора степени зрелости, что позволит обеспечить соответствующие ресурсы и заранее подготовиться к сбору урожая. Должны быть готовы люди и соответствующее оборудование, тара и склады, подготовлены помещения для дозаривания, определены заказчики и адресаты готовой продукции. Любые задержки после сбора урожая снижают качество и срок хранения продукции. За исключением прогнозирования оптимальной зрелости для сбора урожая, остальные показатели должны быть относительно просто измеримыми, объективными и не зависеть от места возделывания, агротехнического предприятия или года. Для разных видов растительного сырья предложены различные показатели степени зрелости, основанные на индикаторах размера, формы, текстуры, твердости, цвета кожуры и мякоти, состава (сахара, кислоты, сумма сухих веществ и т. п.), плотности, развития отделяемых тканей, времени после полного цветения и количестве единиц тепла, полученных в течение процесса развития. Некоторые методы измерения этих индикаторов являются разрушающими (например, для многих видов анализа химического состава растительная ткань должны быть вымочена), а другие — не разрушающими (в том числе анализ плотности, цвета поверхности и др.). В последнее время основное внимание уделяется неразрушающим методам анализа, позволяющим быстро и непосредственно измерять качество любых расфасовываемых овощей и фруктов. Так, встраивание в фасовочно-упаковочную линию датчиков, работающих в ближнеинфракрасной области спектра, позволят проводить сортировку продукции по концентрации сахаров и обеспечивать потребителей продуктами с гарантированным минимальным содержанием сахара. Такая возможность сортировать отдельные плоды по их внутреннему качеству позволяет реализовывать и ту продукцию, которая была бы неприемлемой по показателям внешнего вида.

17.4.2. Температурные режимы

Одним из важнейших внешних факторов для растительного сырья после сбора урожая является температура. Так как респираторная активность собранного сырья при понижении температуры на каждые 10 °С снижается в 2–3 раза, пониженные температуры способствуют уменьшению «дыхания» сырья и тем самым увеличивают срок его хранения. Кроме того, понижение температуры также резко замедляет рост и размножение микроорганизмов, сказывается на других внутренних и внешних факторах (например, на снижении потерь влаги и изменении химического состава сырья). Таким образом, требуется поддерживать как можно более низкие температуры хранения, но без причинения сырью холодовых повреждений или нежелательных изменений его химического состава (например, осахаривания крахмала в картофеле).

После сбора урожая рекомендуется как можно скорее охладить скоропортящееся сырье. У теплого сырья, доставленного с полей, выше респираторная активность, и без охлаждения будет наблюдаться его ускоренное физиологическое старение с последующим быстрым увяданием растительных тканей. Быстрое охлаждение отводит от сырья имеющуюся теплоту и снижает ее выделение при дыхании. Задержка в охлаждении даже на несколько часов может привести к заметному сокращению срока хранения.

17.4.3. Способы охлаждения

В промышленности и торговле используют несколько способов охлаждения, причем у каждого из них есть свои вариации. Выбор того или иного способа зависит от многих факторов — скорости охлаждения (рис. 17.29), особенностей растительного сырья, стоимости, возможности использовать переносные системы и т. п.

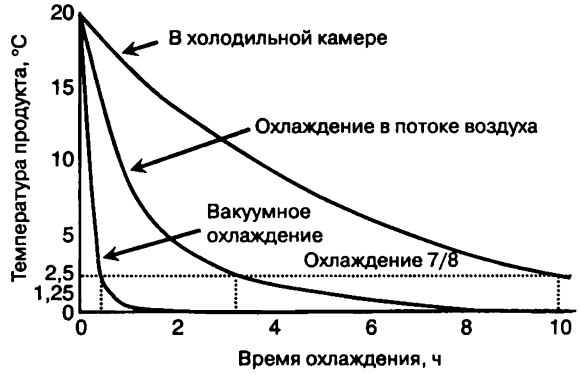


Рис. 17.29. Обобщенные кривые охлаждения в холодильной камере, в принудительном потоке воздуха и с помощью систем вакуумного охлаждения

17.4.3.1. Воздушное охлаждение

При данном способе в качестве хладагента используется воздух. Такие системы охлаждения относительно недороги, поскольку воздух бесплатный и его легко перемещать. Вместе с тем, из-за низкой теплоемкости и теплопроводности воздуха собственно охлаждение занимает много времени. Различают две разновидности воздушного охлаждения — в холодильной камере без движения воздуха и охлаждение в потоке воздуха.

17.4.3.1.1. Охлаждение в холодильной камере

Данный способ подразумевает простое помещение продукта в холодильную камеру и его пассивное охлаждение окружающим продукт воздухом (рис. 17.30). В этом случае требуется меньшая холодопроизводительность, чем при других способах охлаждения, поскольку отведение теплоты распределяется на более длительный период времени (например, на ночь). При этом продукт хранится там же, где и охлаждается. Такой способ охлаждения самый медленный.

17.4.3.1.2. Охлаждение в потоке воздуха

Охлаждение в потоке воздуха подразумевает активную продувку холодного воздуха через упаковки с продуктом с помощью создания градиента давления (рис. 17.31). Данный способ является наиболее распространенным и применяется для охлаждения самого разного растительного сырья, так как охлаждение происходит намного быстрее, чем в обычной холодильной камере (обычно на 25–90%), ускоряется оборот продукции, требуется меньше площадей и т. п. Вместе с тем, данный способ требует большей холодопроизводительности для удаления теплоты.

Если при охлаждении в холодильной камере без принудительного обдува воздухом охлаждение длится довольно долго, то проблемой становится потеря влаги; то же относится и к охлаждению в потоке воздуха, если обдув продолжается и после того, как продукт уже достаточно охладится.

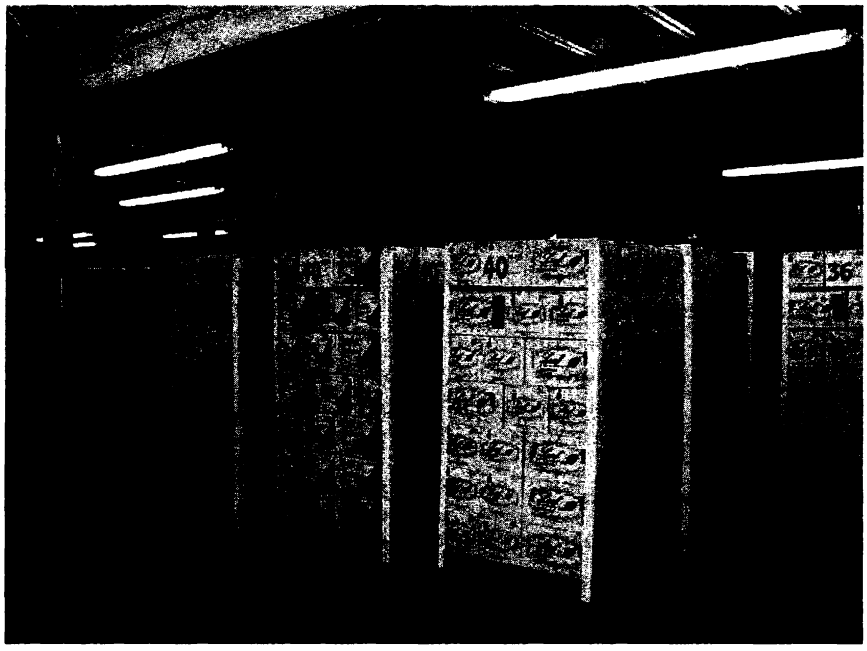


Рис. 17.30. Охлаждение в холодильной камере. Холодный воздух циркулирует в камере с помощью вентиляторов, располагаемых под потолком в конце помещения. Охлаждение происходит только путем пассивной конвекции, причем очень медленно охлаждается лишь небольшая часть поверхности картонных коробок



Рис. 17.31. Туннельный охладитель в потоке воздуха. Два ряда вентилируемых контейнеров с продуктом располагаются так, чтобы маршрут возврата воздуха между рядами оставался открытым для охлаждающих контуров. Продукт накрывают тканью так, чтобы облегчить возврат воздуха в контур охлаждения и его прохождение сквозь продукт. Обратите внимание, что воздушный зазор между полом и паллетами спереди закрыт избытком ткани, а по бокам специальными заглушками. Воздух возвращается в помещение через отверстие в задней стенке над продуктом

17.4.3.2. Охлаждение водой (гидроохлаждение)

В отличие от воздуха, большая теплоемкость воды делает ее эффективным средством охлаждения продуктов, причем растительное сырье в этом случае предохраняется от потерь влаги. Вместе с тем при таком способе охлаждения контейнеры должны быть стойкими к действию воды и содержащихся в ней химических веществ (в частности, моющих и дезинфицирующих). В таких гидроохладителях продукт обычно



Рис. 17.32. Конвейерный гидроохладитель с холодной водой, которую прокачивают по лотку над продуктом, откуда ею орошают растительное сырье, расположенное ниже

охлаждается путем орошения его холодной водой (рис. 17.32) или погружением в холодную воду. Иногда для начального охлаждения используют даже холодную ключевую воду. Гидроохладители иммерсионного типа обычно не годятся для растительного сырья, которое легче воды (оно остается плавать), или для продуктов с большим межклеточным пространством, куда может впитываться вода.

Поскольку вода представляет собой хорошую среду для жизнедеятельности патогенных микроорганизмов, необходимо подвергать ее дезинфекции и очистке. Водяной контур должен обрабатываться хлором или другими дезинфицирующими средствами, качество воды должно постоянно контролироваться, а для снижения численности патогенных микроорганизмов ее необходимо регулярно заменять.

17.4.3.3. Охлаждение льдом

Одним наиболее эффективных способов охлаждения должно было бы быть охлаждение во льду благодаря высокому поглощению теплоты при его таянии, составляющему 80 кал/г. Вместе с тем довольно трудно обеспечить полный контакт между поверхностями льда и продукта, из-за чего охлаждение происходит неравномерно. Ускорить охлаждение можно путем увеличения площади контакта продукта со льдом (например, с помощью ледяной кроши, перемежающихся слоев льда и продукта, жидкого льда и т. п., рис 17.33). Аналогично гидроохлаждению, продукт и контейнеры должны быть водо- и химически стойкими; требуется также очистка и дезинфекция воды. К проблемам данного метода относятся необходимость перемещения более тяжелых продуктов (со льдом), очистки талой воды, стекающей из контейнеров и периодического обновления льда в контейнерах.

17.4.3.4. Вакуумное охлаждение

Особенность вакуумного охлаждения (рис. 17.34) состоит в том, что при этом способе для охлаждения не используется циркуляция хладагента (воздуха или воды). Вместо этого продукт помещают в большие воздухонепроницаемые вакуумируемые камеры. При давлении около 5 мм рт. ст. вода закипает примерно при 0 °С и при ее испарении со скрытой теплотой испарения из продукта отводится около 580 кал тепла/г. Наиболее привлекателен данный способ охлаждения для растительного сырья с высоким отношением поверхности к объему (типа салата-латука), у которого можно равномерно охладить центр продукта. Поскольку при данном способе теряется влага, иногда растительное сырье перед охлаждением орошают водой так, что для охлаждения прежде всего используется добавленная вода, а не влага из продукта.

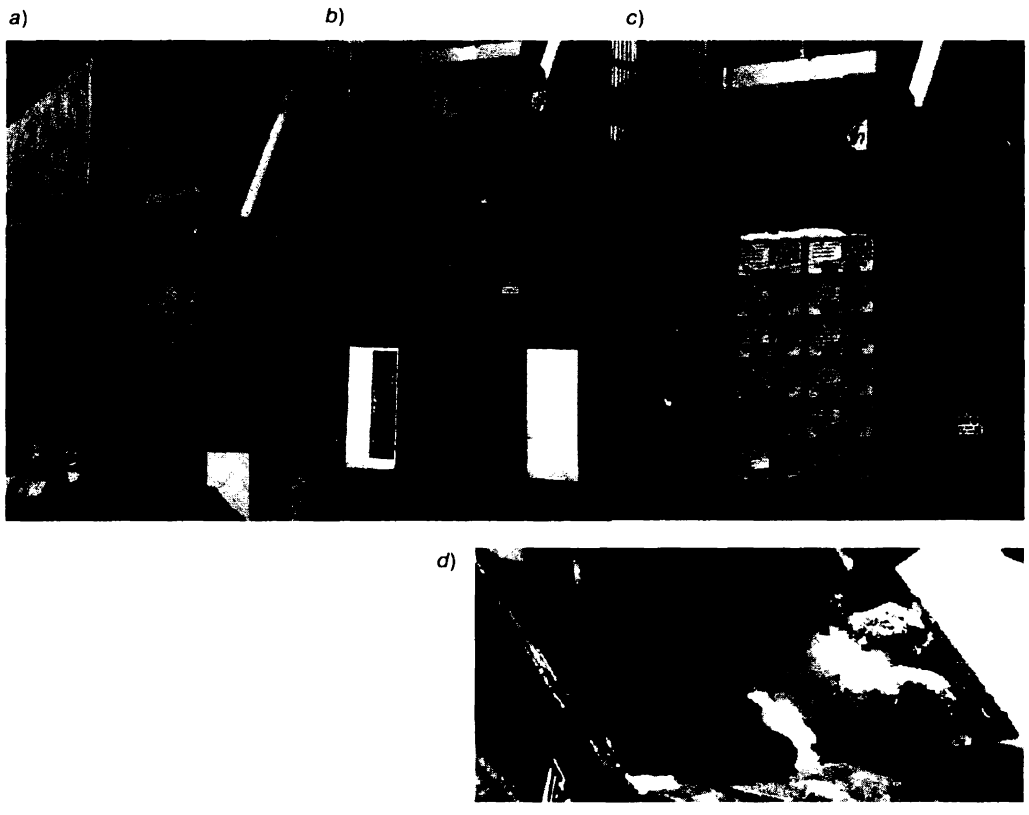


Рис. 17.33. Впрыскивание жидкого льда: *a* —паллеты с упакованным в поле продуктом загружают в охладитель с инжектором; *b* — водоледяная смесь пропускается через паллету сверху вниз; *c* и *d* — лед равномерно распределяется по картонным коробкам

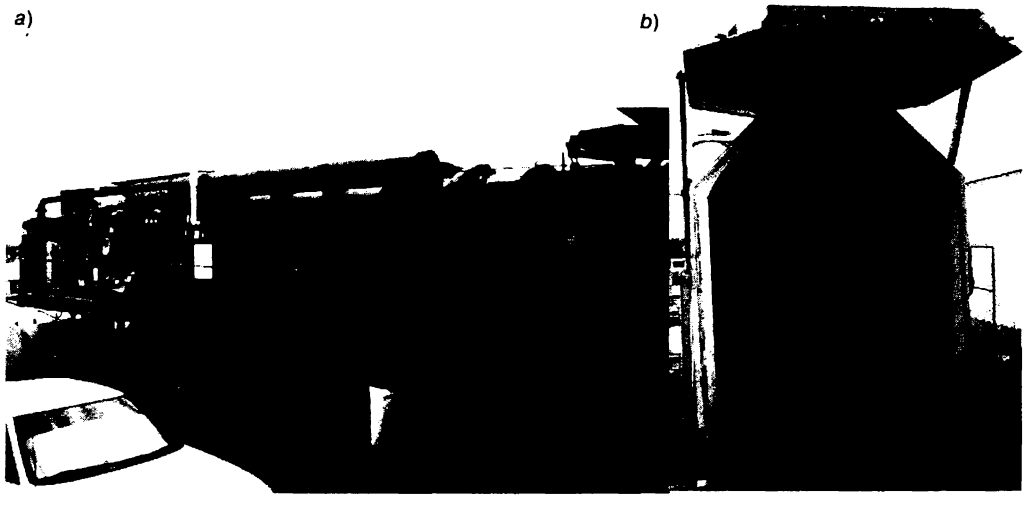


Рис. 17.34. Мобильная вакуумная охлаждающая установка для охлаждения листовых овощей: *a* — вид сбоку; *b* — вид с торца. Продукт загружают в камеру и подвергают вакуумированию вплоть до испарения влаги при температуре около 0 °С; охлаждение происходит по всему объему продукта

17.4.4. Транспортировка и хранение. Хранение в регулируемой и модифицированной газовой среде

Для хранения скоропортящихся овощей и фруктов используют самые разные способы, поскольку большую часть времени их «жизни» после сбора урожая до момента попадания к потребителю составляет время транспортировки и хранения. Подавляющее большинство овощей и фруктов хранят в закрытых помещениях и транспортируют в герметичных транспортных контейнерах, оснащенных механическими устройствами охлаждения, тогда как зерно обычно хранят при комнатных температурах. Наилучшие условия хранения обеспечиваются постоянными температурами охлаждения. Как правило, температура при транспортировке и хранении овощей и фруктов должна колебаться не более чем на ±1 °С от требуемой, причем даже такие колебания могут быть слишком большим вблизи точки замерзания растительного сырья. Большие перепады температур могут привезти к холодовым повреждениям или замораживанию, чрезмерной потере влаги и сокращению сроков реализации.

17.4.4.1. Относительная влажность

Рекомендуемая относительная влажность (ОВ) при хранении большинства скоропортящихся продуктов из растительного сырья составляет 90–95%. Более высокая ОВ (около 100%) может привести к растрескиванию некоторых видов сырья, а конденсация влаги на поверхности может ускорить рост и распространение микроорганизмов.

17.4.4.2. Транспортировка

Более 80% скоропортящихся продуктов из растительного сырья в США перевозится авторефрижераторами. В международной торговле такими скоропортящимися продуктами и морских перевозках преимущественно используют рефрижераторные контейнеры вместимостью 55–65 м^3. Применяемые на автомобильном и морском транспорте системы охлаждения предназначены только для поддержания требуемой температуры, что требует правильного охлаждения продуктов перед транспортировкой. Авиаперевозки используют только для товаров с очень коротким сроком хранения, например, для земляники (клубники) или срезанных цветов. Несмотря на большую скорость авиаперевозок, регулирование температуры в данном случае лишь номинально, и любые задержки в погрузочных и разгрузочных терминалах могут оказаться фатальными для перевозимого груза, поскольку отсутствие температурного регулирования в зонах погрузки и выгрузки приводит к нагреванию или замораживанию товара.

17.4.4.3. Хранение в регулируемой или модифицированной газовой среде

Хранение в регулируемой газовой среде (РГС) подразумевает изменение газовой среды на складах относительно доли в ней O_2 и/или CO_2, причем газовый состав среды должен постоянно и активно регулироваться с допуском примерно ±1% от требуемого состава. Использованию РГС-хранения и транспортировки высококачественной сельскохозяйственной продукции положили начало работы английских ученых Кидда и Уэста [32], старавшихся преодолеть дефицит продуктов перед второй мировой войной и открывших, что некоторые сорта яблок лучше хранятся в газовой среде с меньшим содержанием кислорода и повышенным содержанием диоксида углерода, по сравнению с воздухом [32].

Хранение в модифицированной газовой среде (МГС) принципиально не отличается от РГС-хранения за исключением того, что в этом случае не требуется такого тщательного контроля газового состава. В МГС-системах целенаправленно создается определенный состав газовой среды, который пассивно поддерживается благодаря респираторной активности растительного сырья и ограниченной проницаемости упаковки, транспортного средства или помещения для хранения. Например, в железнодорожных контейнерах CO_2 может просто накапливаться из-за нормальной респираторной активности растительных тканей или сублимации используемого для охлаждения сухого льда (твердого CO_2).

Градиент диффузии для перемещения газов как в сырье, так и из него, зависит от отношения площади поверхности сырья к объему, устойчивости к диффузии (количества и размера пор (устьиц), трещин и разломов в эпидермальном клеточном слое, структуры кутикулы), скорости продуцирования тех или иных

газов растительным сырьем и разницы в парциальном давлении газов внутри и вне данного вида ткани. При хранении овощей и фруктов имеется три уровня барьеров для газообмена (рис. 17.35):

- структура поверхностного слоя растительного сырья и используемой упаковки (пленки);
  полупроницаемый упаковочный материал;
  герметичность помещения или транспортного средства для газов.

Именно этими барьерами определяется состав газовой среды в контейнере или на складе, а также внутри растительной ткани [30].

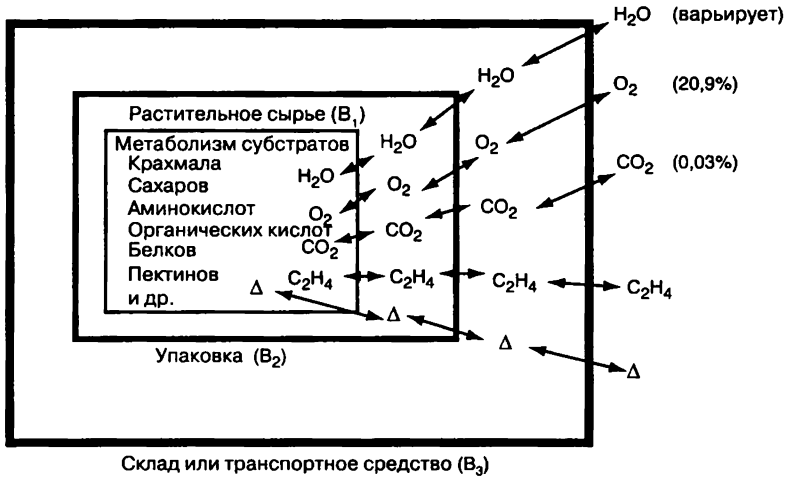


Рис. 17.35. Графическое представление трехуровневого барьера для газообмена при РГС-хранении растительного сырья: B_1 — поверхностная структура сырья и внешнего добавленного слоя (пленки, воска, съедобного покрытия); B_2 — упаковочный материал или помещение для РГС-хранения; B_3 — склад или транспортное средство. По [31]

17.4.4.4. Преимущества РГС- и МГС-хранения

К преимуществам РГС и МГС относятся задержка процессов увядания (включая созревание) и сопутствующих ему биохимических и физиологических изменений (в частности, снижение респираторной активности, продуцирования этилена, размягчения тканей и изменений в химическом составе), ингибирование синтеза этилена и снижение чувствительности продуктов из растительного сырья к его действию, а также уменьшение микробиологической порчи. Несмотря на то что эффективность РГС для увеличения срока хранения была показана на различных видах растительного сырья, применение этого способа в промышленном масштабе ограничивается экономическими причинами и быстрым товарооборотом, что снижает его применимость. Традиционно РГС-хранение на крупных складах применяется для яблок и груш, возрастает применение МГС-упаковок в розничной торговле, особенно упаковок со скоропортящимися свежими овощами и фруктами. Такая возможность обусловлена выделением при их дыхании газов и применением упаковочных материалов с требуемой проницаемостью для газов. Хранение при пониженном давлении с успехом применяется в промышленном выращивании цветов и торговле ими, но для хранения и транспортировки овощей и фруктов оно еще промышленно не используется прежде всего из-за больших затрат по сравнению с РГС-хранением. Особенно важно для хранения продуктов в МГС-упаковке поддержание постоянной температуры, поскольку даже небольшие температурные колебания оказывают сильное воздействие на респираторную активность и слабо влияют на проницаемость упаковки.

17.4.4.5. Дефекты, обусловленные РГС-хранением

Различные овощи и фрукты по-разному переносят специфические и отличающиеся, зачастую не прогнозируемые, изменения в пониженной концентрации O_2 и повышенной CO_2. Степень их повреждений и выраженность симптомов различаются не только между сортами, но и в рамках одного сорта в зависимости от места выращивания или сезонных климатических условий в одном и том же месте. Различия в чувствительности к повышенному содержанию CO_2 и/или пониженному содержанию O_2 у различных видов растительного сырья или разных сортов одного и того же сырья могут быть обусловлены структур-

ными (анатомическими) или метаболическими причинами. На реакцию растений на условия РГС влияют также степень зрелости растительной ткани в момент сбора урожая и температура хранения. Так, у яблок сорта «Макинтош» (*McIntosh*) при хранении в РГС с 1% O_2 сильнее проявляется потемнение мякоти по мере дозревания.

Если тщательно не контролировать состав газовой среды при хранении, это может привести к катастрофическим результатам, так как в хранящейся продукции могут развиться физиологические нарушения. Некоторые виды растительного сырья, например, капуста-брокколи, земляника и черешня, не слишком чувствительны к повреждениям, обусловленным действием CO_2, и их можно хранить в газовой среде с концентрацией CO_2 до 20%, тогда как у салата-латука может произойти изменение цвета («покоричневение») даже при концентрации CO_2 в 2% и выше. Аналогичным образом газовая среда с высоким содержанием CO_2 и небольшим содержанием O_2 способствует заживлению повреждений клубней картофеля. К другим дефектам, обусловленным использованием РГС- или МГС-хранения, относятся неравномерно дозревание, развитие посторонних привкусов и запахов (из-за анаэробных условий или брожения), большая подверженность порче и ускорение прорастания.

Точные механизмы индуцирования составом газовой среды физиологических нарушений до конца не ясны. Как бы то ни было, имеющиеся данные свидетельствуют, что к нарушениям, обусловленным повышением содержания CO_2 или снижения O_2, можно применить те же принципы, что действуют при холодовых повреждениях. Результаты исследований показывают, что у некоторых видов растительного сырья перед проявлением дефектов достигается токсичное пороговое содержание метаболитов (например, янтарной кислоты, этанола и ацетальдегида). Естественно, что очень трудно отделить первичные зоны проявления того или иного дефекта от распространения их последствий. Вместе с тем, можно полагать, что основным фактором образования таких дефектов являются изменения в респираторной активности и неспособность растительной ткани справляться с возникшим дисбалансом.

Хотя конечный акцептор электронов при респираторной активности (цитохромоксидаза) характеризуется довольно высоким сродством к O_2, очень важно учитывать, что концентрации отдельных газов *in situ* отличаются от их соотношения в газовой среде хранилища, так что определяющими факторами здесь являются степень диффузии конкретного газа в данный вид ткани и его растворимость.

17.5. Некоторые свойства растительного сырья

17.5.1. Зерно, бобовые и семена масличных культур

В отличие от овощей и фруктов, зерновые, бобовые и масличные культуры при хранении достаточно стабильны благодаря тому, что содержание влаги в них ниже критического значения (обычно около 14%) и несколько варьирует в зависимости от вида сырья. Если содержание влаги становится выше критического значения, то возникают проблемы с респираторной активностью, ростом плесени и прорастанием. Чем содержание влаги выше критического, тем серьезнее проблемы. Изменения качества этих видов растительного сырья при хранении довольно невелики и зачастую практически не заметны. Например, необходимость более длительной варки сушеной фасоли по сравнению с обычной является следствием изменений в клеточных мембранах при хранении в условиях повышенной влажности [55].

Помол, дробление или экстракция существенно сокращают сроки хранения зерна, круп, бобовых и семян. Нарушение клеточной компартментализации клеток приводит к смешиванию субстратов и контакту содержимого клетки с кислородом и микроорганизмами. Для продуктов с содержанием влаги, превышающим оптимальное для стабильного хранения, лимитирующим фактором для срока хранения становится окисление липидов. Качество пшеничной хлебопекарной муки после помола из-за окислительных изменений белков повышается, но после достижения некоторого оптимального качества дальнейшее хранение приводит к медленному снижению качества [49].

17.5.2. Вегетативные, цветковые и запасающие органы растений

Отнюдь не все овощи состоят из вегетативных частей растения, но к тем, которые представляют именно их, относятся листовые овощи типа салата-латука, кочанной и брюссельской капусты, сельдерея, ревеня, шпината, листовой свеклы, кормовой капусты, эндивии (цикория салатного) и салата эскариоля, а также

стеблевые овощи типа спаржи и капусты-кольраби. Многие овощи представляют собой подземные запасающие органы — к корням относятся морковь, редис, репа, свекла и батат, к корнеплодам — картофель, а к луковицам — репчатый лук и чеснок (самым употребляемым в пищу овощем является картофель). Очень немногие овощи представляют собой невызревшие цветковые органы — это артишок, капуста-брокколи и цветная капуста. Листовые и цветковые овощи портятся намного быстрее, чем корни и корнеплоды, поскольку после сбора урожая они продолжают развиваться и у них намного выше скорость обмена веществ. Основными причинами порчи овощей являются потеря влаги (увядание), хлорофилла (пожелтение), механические повреждения и физиологические нарушения. У некоторых видов сырья большое значение имеют морфологические изменения (например, рост и отверждение спаржи, сельдерея и т. п.). Основными причинами послеуборочных потерь «корневых» овощей являются их механические повреждения, прорастание, потери влаги, холодовые повреждения и гниение. Подробнее о физиологии овощей и о требованиях к обращению со свежими овощами см. справочник Бартца и Брехта, указанный первым в списке дополнительной литературы.

Все вышеуказанные виды растительного сырья характеризуются неклимактерическим поведением и продуцируют очень мало этилена. Большинство листовых и невызревших цветковых овощей отличаются высокой респираторной активностью, тогда как у корней и корнеплодов она намного ниже. Последние служат для растений «запасающими органами» и выполняют функцию размножения. Именно поэтому они хорошо сопротивляются порче и обладают высокой лежкоспособностью. У листовых же и цветковых овощей такие «запасы» вообще отсутствуют или их очень мало, и они быстро исчерпываются из-за высокой респираторной активности. Подобные овощи можно разделить по степени их респираторной активности (выделению теплоты) на овощи с очень высокой респираторной активностью (РА) (> 40 мг CO_2/кг·ч при 5 °С), к которым относятся спаржа, шпинат, огородная зелень и капуста-брокколи; с высокой (20–40 мг CO_2/кг·ч при 5 °С) — артишок, брюссельская капуста, листья салата-латука, и со средней РА (10–20 мг CO_2/кг·ч при 5 °С) — кочанная и цветная капуста, сельдерей, капуста-кольраби и головки салата-латука. По респираторной активности (РА) корни и корнеплоды делят на две группы: с очень низкой РА (< 8 мг CO_2/кг·ч при 0 °С) — свекла, пастернак, картофель, репчатый лук, корень сельдерея и репа, и с низкой РА (8–12 мг CO_2/кг·ч при 0 °С) — морковь, редис и хрен. У корневых овощей, реализуемых вместе с верхушкой (зеленью), РА выше, чем у собственно корней и корнеплодов (например, РА у моркови с зеленью (35 CO_2/кг·ч при 0 °С) с РА моркови без зелени [13 CO_2/кг·ч при 0 °С]). У картофеля, собранного не созревшим («молодой картофель») РА в два раза выше, чем у созревшего, а у подсушенного картофеля и батата РА ниже, чем у не подсушенного.

17.5.3. Созревшие и несозревшие плоды овощных культур

С ботанической точки зрения у овощей бывают плоды, но их все равно называют овощами из-за способов возделывания и потребления. К плодам овощных культур относят плоды с мякотью (огурцы, кабачки, баклажаны, зеленый перец) и плоды без мякоти (фасоль, лимская фасоль, коровий горох — вигна китайская, зеленый горошек, кормовые бобы, сладкая кукуруза и окра — бамия). Созревшие плоды овощных культур — это томаты, красный перец, тыква крупноплодная и обыкновенная, дыня-канталупа (мускусная дыня), а также высушенные горох и фасоль. Томаты занимают второе место в мире по уровню потребления после картофеля, и частично благодаря такому высокому уровню потребления, они являются главным источником нутриентов в нашем рационе. Дыня-канталупа богата провитамином А, а различные виды перца — витамином С, тогда как бобовые являются основным источником белков, ниацина, тиамина и некоторых минеральных веществ. Плоды овощных культур не могут долго храниться, за исключением тыквы и высушенных бобов, гороха и фасоли.

Для большинства таких плодов овощей характерна неклимактерическая респираторная активность — единственными климактерическими плодами этой группы являются томаты и дыня-канталупа (мускатная дыня не проявляет постоянного климактерического поведения). Уровень респираторной активности варьирует от очень высокого (>100 мг CO_2/кг·ч при 10 °С) у сладкой кукурузы и зеленого горошка до низкого (< 10 мг CO_2/кг·ч при 10 °С) у мускатной дыни и арбуза (арбуз в ботаническом смысле — это ягода). Уровень продуцирования этилена у несозревших и созревших неклимактерических плодов очень низкий (< 0,1 мкл/кг·ч). У созревающих томатов и дыни-канталупы уровень продуцирования этилена бы-

вает очень высоким (> 20 мкл/кг·ч). У собираемых в зрелом состоянии плодов овощных культур удовлетворительная степень спелости достигается только при температурах в пределах 12–25 °С, а оптимальная степень спелости — при температурах 20–22 °С.

17.5.4. Ягоды, семечковые и косточковые фрукты

К ягодам относятся все виды винограда, киви и садовые ягоды. Большинство видов столового винограда — это виноград без косточек, но распространен и виноград с косточками. Плод киви уникален тем, что в нем высоко содержание крахмала, который по мере созревания плода превращается в растворимые СВ. К «садовым» ягодам относятся ежевика, голубика, клюква, малина, земляника (клубника) и многие другие.

За исключением киви, голубики и черники ягоды относятся к неклимактерическим фруктам — их собирают как можно более зрелыми, поскольку после сбора они не дозревают. Виноград, клюква и киви характеризуются относительно небольшой респираторной активностью (5–10 мг CO_2/кг·ч при 5 °С), тогда как у голубики и крыжовника она составляет 10–20 мг CO_2/кг·ч, а у ежевики, малины и земляники с высокой респираторной активностью — 20–40 мг CO_2/кг·ч. У виноградных гроздьев респираторная активность черенков может быть в 15 раз выше, чем у ягод. В отличие от киви с его высоким продуцированием этилена при созревании (10–100 мкл C_2H_4/ кг·ч при 20 °С) и голубики со средним (1-10 мкл C_2H_4/ кг·ч), большинство ягод продуцируют мало этилена (менее 1 мкл C_2H_4/кг·ч).

После сбора содержание растворимых СВ в киви по мере осахаривания крахмала более чем удваивается. Кроме того, у этого фрукта после сбора происходит большое размягчение как реакция даже на следовые количества этилена (5–10 мкг/кг) в атмосфере. Интересно, что климактерическими эти фрукты становятся только после того, как они станут достаточно мягкими для употребления в пищу [56].

Виноград, киви и другие ягоды очень чувствительны к потере влаги. Даже 1%-ные потери влаги у земляники дают заметное ухудшение внешнего вида. Потери влаги у винограда приводят к потемнению черенка, а также сморщиванию и лопанию ягод. Для минимизации потерь влаги ягоды желательно как можно быстрее охладить.

К семечковым плодам относятся яблоки, груши (европейская и азиатская), а также айва. Яблоки и груши относятся к климактерическим фруктам, хотя некоторые азиатские сорта груш неклимактерические. У яблок респираторная активность обычно высокая (5–10 мг CO_2/кг·ч при 5 °С), тогда как у груш она средняя (10–20 мг CO_2/кг·ч). И яблоки, и груши продуцируют этилен (10–100 мкл C_2H_4/кг·ч при 20 °С), а пребывание в этиленсодержащей среде ускоряет климактерическое поведение и дозаривание. Снижение респираторной активности, РГС- или МГС-хранение при низких температурах, а также задержка климактерического поведения путем снижения содержания этилена в газовой среде существенно увеличивает срок хранения яблок.

К косточковым фруктам относятся персики, нектарины, сливы, абрикосы и черешня. Персики, нектарины и сливы доступны на рынке довольно долго (около 5 мес.), поскольку более 100 их сортов созревает в разное время. Из-за гораздо меньшего количества сортов абрикосов и черешни, их присутствие на рынке намного короче.

Персики, нектарины, сливы и абрикосы относятся к климакетрическим плодам с высоким уровнем продуцирования этилена (10–100 мкл C_2H_4/кг·ч при 20 °С), тогда как черешня — к неклимактерическим с низким продуцированием этилена (менее 0,1 мкл C_2H_4/кг·ч). У всех них средняя респираторная активность (10–20 мг CO_2/кг·ч при 5°С).

17.5.5. Субтропические фрукты

Группа субтропических фруктов включает авокадо, анону (черимойю), цитрусовые (апельсины, грейпфруты, лимоны, лаймы, танжерины, помело, кумкват), финики, фиги, ююбы (китайские финики), лонган, японскую мушмулу, сливу личи, оливки, хурму и гранаты. Они характеризуются разным строением, физиологией и составом, что обусловливает разные требования к их транспортировке и хранению после сбора.

Авокадо, анона, фиги и хурма являются климактерическими, а финики, ююба, логнан, японская мушмула, личи, оливки, гранаты и все цитрусовые — неклимактерическими фруктами. Респираторная актив-

ность и продуцирование этилена у всех субтропических фруктов очень разные — от очень низкой РА у фиников до высокой у авокадо и от очень низкого продуцирования этилена у граната и неклимактерических плодов до высокого у авокадо. Скорость порчи также очень разная — от скоропортящихся фиг, у которых срок хранения составляет менее 2 недель, до более лежкоспособных фиников, которые могут храниться до года.

Несмотря на то что цитрусовые — это неклимактерические фрукты, и они продуцируют очень мало этилена, зачастую этилен применяют для стимулирования потерь хлорофилла кожурой, которая становится не такой зеленой и в ней начинают преобладать желто-оранжевые каротиноиды. Такое искусственное «обеззеленивание» чаще проводят в начале сезона, когда натуральные процессы снижения зеленой окраски задерживаются из-за теплых ночных температур. Подобное «обеззеленивание» занимает обычно 1–3 дня и не сказывается на качестве мякоти (в том числе на содержании растворимых СВ, титруемой кислотности и т. п.). Вместе с тем, этилен стимулирует увядание и респираторную активность плодов, так что применять его следует в минимальных количествах. Условия «обеззеленивания» варьируют в зависимости от региона произрастания (табл. 17.18).

Таблица 17.18

Рекомендуемые условия «обеззеленивания» для цитрусовых, выращиваемых во Флориде и в Калифорнии

Показатель	Флорида	Калифорния
Температура, °С	28–29	20–25
Содержание этилена, мг/кг	5	5–10
Относительная влажность, %	90–96	90
Степень вентиляции (количество оборотов воздуха в час)	1	1–2
Циркуляция воздуха	100 куб. футов/мин на контейнер вместимостью 900 фунтов	1 объем помещения/мин

17.5.6. Тропические фрукты

К тропическим фруктам относятся бананы, плоды хлебного дерева, карамбола, дуриан, гуава, джекфрут (плод восточноиндийского хлебного дерева), манго, мангостан, папайя, маракуйя (пассифлора, страстоцвет съедобный), ананас, опунция, саподилла и анона (простая и игольчатая).

Все перечисленные плоды за исключением ананаса и опунции, являются климактерическими. РА у них и продуцирование этилена сильно варьирует — от низкой РА у ананасов и папайи до очень высокой у маракуйи, причем продуцирование этилена у опунции и ананаса низкое, а у маракуйи и саподиллы очень высокое. Лежкоспособность тропических фруктов составляет от 1 до 8 нед.

17.5.7. Свеженарезанные овощи и фрукты

Свеженарезанные овощи и фрукты, то есть собранные, очищенные и/или нарезанные на кусочки в готовый к употреблению продукт, становятся все более важным продуктом пищевой промышленности. Примерами могут служить готовые салатные смеси, измельченный или порванный на мелкие части салат-латук, разделенные соцветия капусты-брокколи или цветной капусты, нарезанная кочанная капуста и салат «коулсло», нарубленная или тертая морковь, палочки сельдерея, ломтики цуккини или кабачков, фруктовые салаты; мытый виноград без черенков, дыня и арбуз кубиками или половинками, ломтики или кубики ананаса, а также ломтики яблок, персиков (нектаринов), манго или папайи.

Повреждения овощей и фруктов при приготовлении переключают метаболизм затронутых растительных тканей, что приводит к увеличению респираторной активности, продуцирования этилена, к увяданию и созреванию, а также к ускорению процессов порчи. Удаление эпидермального слоя способствует окислению и потемнению внутренних тканей, увеличению потерь влаги и проникновению в них микроорганизмов. Все это означает, что свеженарезанные овощи и фрукты являются более скоропортящимися, чем те же продукты целиком. Видимыми индикаторами порчи свеженарезанных овощей и фруктов являются вялость из-за потерь влаги, изменения цвета (в частности, усиление окисления поверхностей среза из-за окисления) и контаминация микроорганизмами. Свежие фрукты для нарезки должны быть полно-

стью вызревшими и готовыми к употреблению после вскрытия упаковки с продуктом, а это еще больше увеличивает скорость их порчи.

Особого внимания заслуживает обсеменение микроорганизмами и их рост и размножение на поверхности или внутри свеженарезанных овощей и фруктов, поскольку среди таких микроорганизмов могут оказаться патогенные для человека. Уровень микробиологической контаминации можно снизить путем тщательного соблюдения санитарно-гигиенических норм и правил, поскольку химическая обработка сырья и применение низких температур ограничивают рост и размножение микроорганизмов в ходе хранения, транспортировки и реализации. Порча свеженарезанных овощей и фруктов редко когда может вызвать пищевые отравления, поскольку их срок хранения больше лимитируется физиологическими причинами, а не микробиологическими изменениями.

Для свеженарезанных овощей и фруктов особое значение имеют температурные режимы. Сырья для приготовления таких продуктов предварительно охлаждают, причем в холодном цеху должна поддерживаться температура на уровне 2–7 °С. Только что нарезанные овощи и фрукты сразу же промывают и ополаскивают ледяной водой температурой около 0 °С, после чего их сразу же фасуют и хранят при температуре 1–5 °С, минимизирующей негативные последствия переработки. Иногда на такие продукты наносят съедобное покрытие, препятствующее проникновению кислорода и служащее заодно антимикробным и упрочняющим средством, или химические вещества, повышающие стойкость продукта к окислению и ингибирующее активность оксидаз. Свеженарезанные овощи и фрукты в настоящее время практически всегда реализуют в МГС-упаковке, так как проницаемость упаковочной пленки, площадь ее поверхности и респираторная активность содержимого создают внутри упаковки желаемую газовую среду. Применение такой упаковки способствует сохранению высокого качества свеженарезанных овощей и фруктов и увеличивает срок их хранения благодаря ингибированию процессов обмена веществ, роста и размножения микроорганизмов, реакций потемнения и особенно биосинтеза этилена.

17.6. Влияние на овощи и фрукты процессов их переработки

Основные цели переработки пищевых продуктов — это снизить активность микроорганизмов и затормозить химические изменения, которые способны оказать негативное влияние на потребительское качество пищи, причем при минимальном ухудшении качественных показателей. Способы переработки пищевых продуктов существенно отличаются от рассматривавшихся в предыдущих разделах методов консервирования тем, что при переработке нарушается жизнеспособность живых клеток. Важным преимуществом переработки является то, что с ее помощью можно сохранить съедобность пищевого продукта дольше, чем другими способами. Вместе с тем, из-за жесткости режимов такой переработки в продукте обычно происходят значительные изменения, из-за чего зачастую существенно меняются его качественные показатели. Эти изменения могут быть как желаемыми (например, термическая инактивация антинутритивных факторов, размягчение жестких тканей, формирование вкуса и аромата), так и нежелательными (в том числе потеря витаминов, обесцвечивание, изменения текстуры и образование побочных привкусов и запахов). В результате в зависимости от местных предпочтений и пищевых привычек потребителей продукт может оказаться для них неприемлемым.

17.6.1. Химические изменения

Скорость химических реакций в пищевом сырье представляет собой результат действия многих факторов, прежде всего концентрации реагирующих веществ, их доступности и мобильности, температуры, значения pH; окислительно-восстановительного потенциала, а также действия ингибиторов и катализаторов. Из-за этого влияние переработки на скорость химических изменений в овощах и фруктах будет разной в зависимости от способа переработки и состава растительных тканей. При переработке одного и того же вида растительного сырья наблюдаются существенные различия в зависимости от сорта (культивара) и от условий его выращивания и хранения. Реакции, происходящие в растительных тканях, тоже разные, за исключением тех, которые протекают в еще «живых» тканях и включают специфические для данного растения компоненты. Так, химические изменения крахмала при консервировании цельного картофеля принципиально не отличаются от реакций, протекающих в картофельном крахмале при его консервиро-

вании как части супа. Тем не менее, существуют важные физические отличия, связанные с тем, являются ли зерна крахмала частью клеточной структуры или они просто диспергированы в воде, так что такие физические отличия могут влиять на скорость и глубину химических реакций. Примеры реакций, протекающих при переработке и хранении овощей и фруктов, приведены в табл. 17.19. Из-за многообразия и сложности тканей овощей и фруктов зачастую бывает довольно трудно спрогнозировать влияние последствий переработки и условий хранения на ход химических реакций и их влияние на качество продукции. Более подробное описание этих химических реакций приводится в соответствующих главах, посвященных отдельным компонентам пищевых продуктов.

17.6.2. Ферментативные реакции

Выше мы уже неоднократно отмечали роль разрушения клеток в химических реакциях в живых растительных тканях. Даже для термической стерилизации пищевых продуктов при разрушении клеток в ходе очистки овощей и фруктов, измельчении и т. п. большое значение для происходящих химических реакций имеет предварительная инактивация ферментов. Для минимизации этих изменений разработаны различные технологии, призванные сократить промежуток времени между разрушением клеток и инактивацией ферментов. Именно это является задачей предварительного бланширования перед тепловой обработкой или замораживанием. Неплохим примером таких технологических операций может служить «горячая пауза» при переработке томатов, при которой полигалактуроназа (*PG*) инактивируется еще до начала существенного снижения вязкости. Вместе с тем, в переработке апельсинового сока некоторые полигалактуроназы достаточно термостойки, и когда все они термически инактивируются, происходит существенное изменение вкуса и аромата. Именно недостаточная инактивация *PG* и полиметилэстеразы (*PME*) в апельсиновом соке является причиной образования нестабильной мути и ухудшения внешнего вида продукта.

17.6.3. Разрушение клеток

В неферментативных изменениях большая роль принадлежит также нарушению целостности клеток. При разрушении центральной вакуоли высвобождается кислота, изменяющая значение pH данной ткани и скорость многих зависимых от pH реакций. Особенно заметным следствием этого является изменение цвета. Разрушение клеток из-за повышения концентрации кислорода повышает также скорость неферментативного окисления. При замораживании растительных тканей обычно считается, что непосредственно физическое нарушение целостности и структуры относительно жестких растительных клеток обусловливается образованием кристаллов льда, что косвенно приводит к негативным последствиям из-за повышения концентрации молекул растворителя в незамороженной фазе. Растительные ткани различаются по своей подверженности подобным явлениям, что подтверждается различиями в дефектах от замораживания у томатов, по сравнению с картофелем или зерном пшеницы. Под влиянием температуры замораживания скорости реакций после разрушения клеток существенно отличаются от тех, которые характерны для реакций после разрушения клеток в условиях более высоких температур, когда быстрее протекают ферментативные и химические процессы.

17.6.4. Изменения структуры молекул

На протекающие при переработке химические реакции влияет не только разрушение клеток. При тепловой обработке происходит денатурация белков, меняются взаимодействия белков с жирами и водой и т. д. Для производства продукции с длительным сроком хранения очень важно инактивировать ферменты. Кроме того, при тепловой обработке необратимо изменяется структура клеточных мембран, в частности хлоропластов, из-за чего более доступными для реакций становятся их компоненты (хлорофилл, липиды и белки). Нарушение нативной для красящих веществ окружающей среды приводит к изменению цвета.

Полисахариды растительных клеток по своему нативному состоянию высокоупорядочены, и от этой упорядоченности зависит структурная целостность клеток. Нагревание обычно приводит к тому, что крупные молекулы полисахаридов впитывают воду, «разбухают» и становятся более подвижными и доступными для химических реакций. Кроме того, подобное «разбухание» приводит к разрушению клеточной структуры, достаточному для инициирования изменений в близлежащих компонентах. Зерна крахмала

Таблица 17.19

Примеры неферментативных реакций, влияющих на качество переработанных овощей и фруктов

Реагирующее вещество	Продукт или результат реакции	Значимые факторы
Хлорофилл	Феофитин	Этой реакции способствуют низкие значения pH и высокие температуры, приводящие к побурению консервированных зеленых овощей
Глутамин	Пироглутаминовая (пирролидонкарбоновая) кислота, *PCA*	Считается, что *PCA*, образующаяся при тепловой обработке консервированных овощей, способствует катализируемому кислотой образованию феофитина и возникновению постороннего привкуса и запаха
Транс-каротиноиды	*Цис-транс*-каротиноиды	Теплота, свет и слабокислые условия приводят к полной изомеризации *транс*-каротиноидов до их *цис*-изомеров, что обусловливает потерю активности витамина А и изменения цвета
Тиамин	Пиримидин и тиазол	Нагревание при pH < 6 приводит у витамина B_1 к распаду метиленовых мостиков и образованию пиримидина и тиазола
Аскорбиновая кислота	Дегидроаскорбиновая кислота, дикетогулоновая кислота и др.	Окисление в присутствии молекулярного O_2 приводит к потере активности витамина С и может сочетаться с другими восстановительными реакциями, в частности с образованием дисульфидных связей при образовании клейковины (глютена) или превращении этанола в ацетальдегид при созревании вин
Аскорбиновая кислота	3-Деоксипентулоза, 2-фуральдегид	В сильнокислых продуктах типа лимонного сока происходит неокислительное расщепление аскорбиновой кислоты. Считается, что эта реакция участвует в «аскорбатном потемнении» подобных продуктов
Гликозиды	Продукты гидролиза	Умеренно кислые условия и нагревание приводят к гидролизу гликозидных связей. Фенольные гликозиды гидролизуются в умеренно щелочных условиях. Эти реакции влияют на текстуру, вкус и аромат овощей и фруктов
Редуцирующие сахара, аминокислоты	Неферментативное потемнение (реакция Майера)	На эту важную реакцию, обусловливающую цвет, вкус и аромат, а также на безопасность продукта для здоровья, влияют концентрация реагентов, повышенные температуры и щелочное значение pH; данная реакция негативно сказывается на пищевой ценности переработанных овощей и фруктов
Органические кислоты, Ca^{2+}	Хелатные комплексы с Ca^{2+}	Фитиновая или лимонная кислоты способны образовывать хелатные комплексы с ионами Ca^{2+} из пектата и обусловливать тем самым размягчение консервированных фруктов
Амилоза	Кристаллизация	Выравнивание линейных цепочек крахмала приводит к формированию нерастворимых преципитатов, обусловливающих такие процессы, как, например, черствение хлебобулочных изделий
Метилметионин	Диметилсульфид	При термическом расщеплении серосодержащих соединений образуются многочисленные важные вкусоароматические вещества
Сероводород	Обесцвечивание	Под действием сульфида железа на консервных банках и на картофеле появляются черные пятна
Fe^{2+}	Fe^{3+}	Двумя важнейшими последствиями окисления железа являются усиление окисления липидов и абсорбция восстановленного железа
Органические кислоты	Мраморность, обусловленная разрушением полуды	Покрытие жестяных банок защитной эмалью намного снижает солюбилизацию металла кислотой
Антоцианин, SO_2	Обесцвечивание	Обесцвечивание обусловливается добавлением SO_2 в 4-ю позицию антоцианинов с образованием бисульфитов

являются наиболее знакомым примером, где в клеточных стенках происходят аналогичные изменения, пусть и в меньшей степени.

17.6.5. Прочие факторы изменения скорости реакций

Помимо рассмотренных выше структурных изменений, с тепловой обработкой связаны и другие воздействия на отдельные компоненты растительной ткани, зависящие от продолжительности и температуры обработки, а также от энергии активации конкретных реакций. Примеры подобных реакций приведены в разных главах данной книги. Так, сушка растительных тканей приводит к повышению концентрации растворенных веществ, к их миграции, и в зависимости от применяемой технологии сушки, эти ткани могут подвергаться действию высоких температур и кислорода. Все это повышает скорость химических реакций, а миграция и повышение концентрации растворенных веществ оказывают сильное воздействие на макромолекулы и резко меняют поведение высушенных продуктов из растительного сырья при регидратации.

17.7. Краткое резюме

По мере роста численности населения Земли и сокращения площадей культивируемых сельхозугодий, возникают проблемы с доступностью пищевых продуктов, и растительное сырье постепенно вытесняет продукты животного происхождения. Тем самым вегетарианство (общее и в лечебных целях) существенно повышает потребность в пищевых продуктах из растительного сырья. К сожалению, наши знания физиологии съедобных частей растений после их сбора еще недостаточны, и для совершенствования способов переработки овощей и фруктов, для обеспечения потребителей продуктами растительного происхождения наивысшего качества необходимы дальнейшие научные исследования. Фундаментальные исследования в области физиологии растений позволяют разрабатывать новые подходы к производству пищевых продуктов из растительного сырья, к улучшению их качества и способов консервирования. Большим потенциалом для резкого повышения качества многих таких продуктов обладают технологии генной инженерии (рекомбинантной ДНК), однако для прогресса в этой области необходимо четко понимать биохимические факторы качества.

Дополнительная литература

Bartz J. A., Brecht J. K. (eds)) *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables.* — NY: Marcel Dekker, 2003.

Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* — Rockville, MD: Amer. Soc. Plant Biol., 2000.

Esau K. *Anatomy of Seed Plants.* — 2nd ed. — NY: Wiley, 1977.

Eskin N. A. M. *Quality and Preservation of Vegetables.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.

Eskin N. A. M. *Quality and Preservation of Fruits.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

Gross K. C., Wang C. Y., Saltveit M. E. (eds). *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks.* — Draft revised April 2004, USDA, Agric. Hb. No. 66 (http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html).

Hooykaas P. J. J., Hall M. A., Libbenga K. R. (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones.* — Amsterdam: Elsevier, 1999.

Kader A. A. (ed.) *Postharvest Technology of Horticultural Crops.* — Univ. of Calif., Div. of Agric. and Nat. Resources, 2002. — Special Publ. 3311.

Kanellis A. K., Chang C., Klee H., Bleecker A. B., Pech J. C., Grierson D. (eds) *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene.* — London: Kluwer, 1999.

Kays S. J., Paull R. E. *Postharvest Biology.* — Athens, GA: Exon Press, 2004.

Knee M. *Fruit Quality and Its Biological Basis.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.

Shaw P. E., Chan H. T., Jr., Nagy S. *Tropical and Subtropical Fruits.* — Auburndale, FL: Agscience, 1998.

Thomson A. K. *Fruit and Vegetables. Harvesting, Handling and Storage.* — Oxford: Blackwell Publ., 2003.

Tomas-Barberan F. A., Robins R. J. (eds.) *Phytochemistry of Fruit and Vegetables.* — NY: Oxford University Press, 1997.

University of California, Davis Postharvest Technology Research & Education Center website (http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/index.html).

University of Florida, Postharvest Programs & Information website (*http://postharvest.ifas.ufl.edu*).

Wardowski W., Miller, W. M., Hall D. J., Grierson W. *Fresh Citrus Fruits.* — 2nd ed. — Longboat Key, FL: Florida Science Source, 2006.

Литература

1. Amir J., Wright R. D., Cherry J. H. Chemical control of sucrose conversion to polysaccharides in sweet corn after harvest // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 1971, 19, p. 954, 971.
2. Ap-Rees, T., Dixon W. L., Pollack C. J., Franks F. Low temperature sweetening of higher plants // *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables* / J. Friend, M. J. C. Rhodes (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 41–60.
3. Babic I., Amiot M. J., Nguyen T. C., Aubert S. Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage // *J. of Food Science,* 1993, 58, p. 351–356.
4. Ballentine D. A. Manufacturing and chemistry of tea // *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. I. Analysis, Occurrence & Chemistry* / C. T. Ho, C. Y. Lee, M. T. Huang (eds). — Washington, DC: American Chemical Society, 1992. — P. 102–117.
5. Barichello V., Yada R. Y., Coffin R. H., Stanley D. W. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes. Starch structure and composition // *J. of Food Science,* 1990, 55, p. 1054.
6. Bartley I. M., Knee M. The chemistry of textural changes in fruit during storage // *Food Chemistry,* 1982, 9, p. 47–58.
7. Beck C. I., Ullrich T. Biotechnology in the food industry // *Bio/Technology,* 1993, 11, p. 895–902.
8. Belitz H.-D., Grosch W. *Food Chemistry.* — 1st English ed. — Berlin: Springer-Verlag, 1987. — P. 774.
9. Biale J. Young R. E. Respiration and ripening of fruits — retrospect and prospect // *Recent Advances in Biochemistry of Fruits and Vegetables* / J. Friend, M. J. C. Rhodes (eds). — NY: Academic Press, 1981. — P. 89.
10. Brady C. J., O'Connel P. B. H., Palmer J. K., Smille R. M. An increase in protein synthesis during ripening of the banana fruit // *Phytochemistry,* 1970, 9, p. 1037–1047.
11. Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses // *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* / W. Gruissem, B. Buchannan, R. Jones (eds). — Rockville, MD: American Society of Plant Physiology, 2000. — P. 1158–1249.
12. Brummell D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit // *Functional Plant Biology,* 2006, 33, p. 103–119.
13. Butler L. G. Effect of condensed tannins on animal nutrition // *Chemistry and Significance of Condensed Tannins* / R. W. Hemingway, J. J. Karchesy (eds). — NY: Plenum Press, 1988. — P. 343–396.
14. Carrington C. M. S., Greve L. C., Labavitch J. M. Cell wall metabolism in ripening fruit. VI. Effect of antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes // *Plant Physiology,* 1993, 103, p. 429–434.
15. Cassab G. I. Varner J. E. Cell wall proteins // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* 1988, 39, p. 321–353.
16. Eliasson A.-C., Larsson K. *Cereals in Breadmaking: A Molecular Colloidal Approach.* — NY: Marcel Dekker, 1993.
17. Faith N. G., Yousef A. E., Luchansky J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke // *J. of Food Safety,* 1992, 12, p. 263–314.
18. French D. A., Kader A. A., Labavitch J. M. Softening of canned apricots: a chelation hypothesis // *J. of Food Science,* 1989, 54, p. 86–89.
19. Gaser C. S., Fraley R. T. Genetically engineering plants for crop improvement // *Science,* 1989, 244, p. 1293–1299.
20. Gerrior S., Bente L. Nutrient Content of the U.S. Food Supply, 1909–99: A Summary Report / U.S. Department of Agriculture, Center for Nutrition Policy and Promotion. — Home Economics Research Report № 55, 2002.
21. Glenn G. W., Poovaiah B. W. Calcium mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in Golden Delicious apples // *J. of the American Society for Horticultural Science,* 1990, 115, p. 962–968.
22. Guclu R., Paulin A., Soudain P. Changes in polar lipids during ripening and senescence of cherry tomato *(Lycopersicon esculentum):* relation to climacteric and ethylene increases // *Physiologia Plantarum,* 1989, 71, p. 413–419.
23. Haard N. F. Stress metabolites // *Postharvest Physiology and Crop Protection* / M. Lieberman (ed.). — Westport, CT: Food and Nutrition Press, 1983. — P. 433–448.
24. Hamada J. S., Marshall W. E. Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy proteins // *J. of Food Science,* 1989, 54, p. 595–601, 635.
25. Haslan E., Lilley T. H., Warminski E. et al. Polyphenol complexation: a study in molecular recognition // *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. I. Analysis, Occurrence & Chemistry* / C. T. Ho, C. Y. Lee, M. T. Huang (eds). — Washington, DC: American Chemical Society, 1992. — P. 8–50.
26. Hayakawa K. I. Temperature: energy flux in stores // *Postharvest Physiology of Vegetables* / (J. Weichmann (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 181–202.
27. Ho C. T., Lee C. Y., Huang M. T. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. I. Analysis, Occurrence, & Chemistry.* — Washington, DC: American Chemical Society, 1992.
28. Huff A. Sugar regulation of plastid interconversion in epicarp of citrus fruit // *Plant Physiology,* 1984, 76, p. 307.
29. Janick J. R., Schery W., Woods F. W., Ruttan V. M. Food and human needs // *Plant Science* / J. Janick, R. W. Schery, F. W. Woods, V. M. Ruttan (eds). — San Francisco, CA: W. H. Freeman, 1969. — P. 37–52.
30. Kader A. A. Respiration and gas exchange of vegetables // *Postharvest Physiology of Vegetables* / J. Weichmann (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 25–43.
31. Kader A. A., Saltveit M. E. Respiration and gas exchange of vegetables // *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables* / J. A. Bartz, J. K. Brecht (eds). — 2nd ed. — NY: Marcel Dekker, 2003. — P. 7–29.

32. Kidd F., West C. A relation between the concentration of oxygen and carbon dioxide in the atmosphere, rate of respiration, and length of storage of apples: Report to the Food Investment Board, London for 1925, 1926. —1927. — P. 41–42.
33. Klein B., Grossman S. Co-oxidation reaction of lipoxygenases in plant systems // *Advances in Free Radical Biology and Medicine,* 1985, 1, p. 309.
34. Koch J. L., Nevins D. E. The tomato fruit cell wall. II. Polyuronide metabolism in a non-softening tomato mutant // *Plant Physiology,* 1990, 92, p. 642–647.
35. Lesham Y. Y. Plant senescence processes and free radicals // *Free Radical Biology and Medicine,* 1988, 5, p. 39–49.
36. Lurie S., Klein J. D. Cyanide metabolism in relation to ethylene production and cyanide insensitive respiration in climacteric and nonclimacteric fruits // *J. of Plant Physiology,* 1989, 135, p. 518–521.
37. Macko V., Stegmann H. Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis // *Hoppe-Seyler's Zeitschriftfur Physiologische Chemie,* 1969, 350, S. 917–919.
38. Maquire Y. P., Haard N. F. Fluorescent product accumulation in ripening fruit // *Nature,* 1975, 258, p. 599–600.
39. Martineau B. *First Fruit: The Creation of the Flavr Savr Tomato and the Birth of Biotech Foods.* — NY: McGraw-Hill, 2001.
40. Mateos M., Ke D., Cantwell M., Kader A. A. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO_2-enriched atmospheres // *Postharvest Biology and Technology,* 1993, 3, p. 225–233.
41. Mitcham E., Gross K., Ng T. Tomato fruit cell wall synthesis during development and senescence // *Plant Physiology,* 1989, 89, p. 477–481.
42. Muller-Rober B., Sonnewald U., Willmitzer L. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes // *EMBO J.,* 1992, 11, p. 1229–1238.
43. Ness A. R., Powles J. W. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review // *Intern. J. of Epidemiology,* 1997, 26, p. 1–13.
44. Newman R. H., Ha M. A., Melton L. D. Solid state ^{13}C NMR investigation of molecular ordering in the cellulose of apple cell walls // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 1994, 42, p. 1402–1406.
45. Oeller P. W., Wong L. M., Taylor L. P., Pike D. A., Theologis A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA // *Nature,* 1991, 254, p. 437–439.
46. O'Donoghue E. M., Huber D. J. Modification of matrix polysaccharides during avocado fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase // *Physiologia Plantarum,* 1992, 86, p. 33–42.
47. O'Malley R. C., Rodriguez F. I., Esch J. J. et al. Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato // *Plant J.,* 2005, 41, p. 651–659.
48. Picton S., Barton S. L., Bouzayen M., Hamilton A. J. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene // *Plant J.,* 1993, 3, p. 469–481.
49. Pomeranz Y. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage // *Storage of Cereal Grains and Their Products* / D. B. Sauer (ed.). — St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1992. — P. 55–141.
50. Pomeranz Y., Chung O. K. Interaction of lipids with proteins and carbohydrates in breadmaking // *J. of the American Oil Chemists' Society,* 1978, 55, p. 285–289.
51. Powell C., Clifford M. N., Opie S. C., Ford M. A., Robertson A., Gibson C. L. Tea cream formulation: the contribution of black tea phenolic pigments // *J. of the Science of Food and Agriculture,* 1993, 63, p. 77–86.
52. Pratt D. E. Natural antioxidants from plant material // *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. I. Analysis, Occurrence, & Chemistry* / C. T. Ho, C. Y. Lee, M. T. Huang (eds). — Washington, DC: American Chemical Society, 1992. — P. 54–71.
53. Radley J. A. *Starch and Its Derivatives.* — London: Chapman and Hall, 1968.
54. Raison J. K., Lyons J. M., Mahlhoin R. J., Keith A. D. Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling // *J. of Biological Chemistry,* 1971, 246, p. 4036–4040.
55. Richardson J. C., Stanley D. W. Relationship of loss of membrane functionality and hard-to-cook defect in aged beans // *J. of Food Science,* 1991, 56, p. 590–591.
56. Ritenour M. A., Crisosto C. H., Garner D. T., Cheng G. W., Zoffoli J. P. Temperature, length of cold storage and maturity influence the ripening rate of ethylene-preconditioned kiwifruit // *Postharvest Biology and Technology,* 1999, 15, p. 107–115.
57. Salunke D. K., Jadhav S. J., Kadam S. S., Chavan J. K. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes // *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 1982, 17, p. 277–305.
58. Schwimmer S. Enzyme action and modification of cellular integrity in fruits and vegetables: consequences for food quality during ripening, senescence and processing // *Postharvest Biology and Biotechnology* / H. O. Hultin, M. Milner (eds). — Westport, CT: Food and Nutrition Press, 1978. — P. 37.
59. Sisler E. C. The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level // *Biotechnology Advances,* 2006, 24, p. 357–367.
60. Snook J. T. *Nutrition.* — Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1984/ — P. 521.
61. Spanos G. A., Wrolstad R. E. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage —a review // *J. of Agricultural and Food Chemistry,* 1994, 40, p. 1478–1487.

62. Stegemann H. Properties and physiological changes in storage proteins // *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins* / J. B. Harborne, C. F. van Sumere (eds). — NY: Academic Press, 1975. — P. 71.
63. Tigchelaar E. C., McGlasson W. B., Franklin M. J. Genetic regulation of tomato fruit ripening // *HortScience,* 1978, 13, p. 508.
64. Toma R. B., Fansler L. T., Knipe M. T. World food shortage: the third dimension // *Urban and Rural Development in Third World Countries: Problems of Population in Developing Nations* / J. Valentine (ed.). — Jefferson, NC: McFarland, 1991. — P. 61–66.
65. Torre M., Rodriguez A. R. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability // *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 1991, 30, p. 1–22.
66. Nutrient Database for Standard Reference, Release 14. U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient Data Laboratory / USDA. — Beltsville, MD, 2002. — [CD-ROM].
67. Van't Veer P., Jansen M. C J. F., Klerk M., Kok F. J. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease // *Public Health Nutrition,* 2000, 3, p. 103–107.
68. Wade N. L., Satyan S. H., Kavanagh E. E. Increase in low molecular size uronic acid in ripening banana fruit // *J. of the Science of Food and Agriculture,* 1993, 63, p. 257–259.
69. Wagner A. M., Kneppers T. J. A., Kroon B. M., Plas L. H. W. Enzymes of the pentose phosphate pathway in callus forming potato discs grown at various temperatures // *Plant Science,* 1987, 57, p. 159.
70. Wang C. Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress // *HortScience,* 1982, 17, p. 173–186.
71. Watada A. E., Herner R. C., Kader A. A., Romani R. J., Staby G. L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops // *HortScience,* 1984, 19, p. 20–21.
72. Weichmann J. Minerals // *Postharvest Physiology of Vegetables* / J. Weichmann (ed.). — NY: Marcel Dekker, 1987. — P. 481–488.
73. Wicker L., Vassallo M. R., Echeverria E. J. Solubilization of cell wall bound, thermostable pectinesterases from Valencia orange // *J. of Food Science,* 1988, 53, p. 1171–1174.
74. Williams R. J. P. The necessary and desirable production of radicals in biology // *Philosophical Transactions of the Royal Society London B,* 1985, 311, p. 593–603.
75. Yang S. F., Hoffman N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants // *Annual Review of Plant Physiology,* 1984, 35, p. 155.

18. ВЛИЯНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ НА ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫЕ РЕСУРСЫ И КАЧЕСТВО ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Мартина Ньюэлл-МакГлафлин (*Martina Newell-McGloughlin*)
Перевод Т. О. Зверевич под науч. ред. канд. мед. наук Н. В. Тышко

Содержание

18.1. Введение. 971
18.2. Что такое «биотехнология»? .. 971
18.3. Краткий исторический экскурс. . 972
18.4. Общие сведения о биотехнологиях 974
18.4.1. Технология рекомбинантных ДНК..... 974
18.4.2. Полимеразная цепная реакция 974
18.4.3. Микроматрицы ДНК..... 975
18.4.4. Антисмысловая технология 977
18.4.5. Рибозимы 978
18.4.6. Рибопереключатели... .. 978
18.4.7. РНК-сайленсинг 978
18.4.8. Генная инженерия белка.... .. 981
18.4.9. Геномика и протеомика 982
18.4.10. Биоинформатика и метаболомика..... .. 983
18.5. Промышленная биотехнология. Ферменты, пищевые продукты и корма для животных. .. 983
18.5.1. Генная инженерия ферментов 985
18.5.2. Перспективы ферментных технологий 988
18.6. Растениеводство 989
18.6.1. Растениеводство и садоводство. Производство пищевых продуктов и кормов для животных из растительного сырья . 989
18.6.1.1. Трансформация растений 989
18.6.1.2. Агрономия трансгенных растений .. 991
18.6.1.3. Переработка пищевых продуктов и их функциональные свойства. Вопросы безопасности для здоровья и пищевой ценности . 995
18.6.1.4. Метаболическая инженерия. .. 998
18.6.2. Макронутриенты 998
18.6.2.1. Белок .. 998
18.6.2.2. Углеводы .. 999
18.6.2.3. Пищевые волокна 1000
18.6.2.4. Жиры 1001
18.6.3. Микронутриенты.. 1003
18.6.3.1. Витамины и минеральные вещества... 1003
18.6.3.2. Фитохимические вещества. 1006
18.6.3.3. Антинутриенты..... 1008
18.6.3.4. Аллергены 1009
18.6.3.5. Токсины .. 1010
18.6.4. Перспективы биотехнологии сельскохозяйственных культур. 1010
18.7. Животноводство 1010

18.7.1. Методы получения трансгенных животных 1010
18.7.2. Использование трансгенных животных. 1012
18.7.3. Рыбоводство 1013
18.8. Диагностика 1014
18.8.1. Биосенсоры. 1015
18.9. Безопасность генно-модифицированного растительного сырья. . 1016
18.9.1. Этикетирование и маркировка 1019
18.9.2. Генно-модифицированное лекарственное сырье. 1019
18.10. Краткое резюме. . . 1020
Литература. . . 1021

18.1. Введение

В ближайшие десятилетия пищевой промышленности предстоит работать в быстро меняющихся внешних социально-экономических условиях, что будет обусловлено, с одной стороны, усилением конкуренции и глобализацией, а с другой стороны, ростом потребительского спроса на качественные, безопасные, полезные для здоровья и удобные в использовании пищевые продукты. В США пищевая промышленность — это крупнейшая отрасль производства, ежегодный валовый доход которой превышает $500 млрд. Основными приоритетами научно-технических и экономических исследований в области производства пищевого сырья и продуктов в ближайшее время будут:

повышение эффективности производства и уменьшение его воздействия на окружающую среду;

изучение взаимодействий между компонентами в составе пищевых систем, и использование полученных знаний при производстве пищевых продуктов;

разработка и внедрение мер предупреждения пищевых отравлений и заболеваний, связанных с неправильным питанием;

разработка и внедрение в производство пищевых продуктов с заданным химическим составом и свойствами;

развитие технологий получения продуктов с повышенной добавленной стоимостью.

Использование биотехнологических методов открывает новые возможности для использования инноваций в сельском хозяйстве и в пищевой промышленности. Агропромышленные биотехнологии позволяют увеличить производство, повысить качество и диетические свойства пищевых продуктов, снизить зависимость сельского хозяйства от химических удобрений, уменьшить биотические и абиотические стрессы, снизить себестоимость сырья. Все это может быть достигнуто методами и способами, не оказывающими негативного воздействия на состояние окружающей среды.

Несмотря на то что масштаб влияния биотехнологии на пищевую промышленность довольно велик, существуют четыре основных направления использования биотехнологических методов: растениеводство, животноводство, переработка пищевых продуктов с использованием биотехнологий и диагностика. Именно их мы рассмотрим в настоящей главе. Мы также коснемся вопросов развития и применения биотехнологии в пищевой промышленности и при производстве комбикормов в более широкой перспективе стандартизации, правового регулирования и развития общества.

18.2. Что такое «биотехнология»?

В широком смысле биотехнология — это комплекс методов, позволяющих изменять живые организмы путем воздействия либо на весь организм в целом, либо на его внутриклеточные компоненты в целях получения новых продуктов или разработки технологических процессов. Так, еще задолго до появления письменности люди научились использовать микроорганизмы для получения пищевых продуктов. Например, процессы брожения и сквашивания, протекающие при непосредственном участии микроорганизмов, широко используются в хлебопечении, а процесс сбраживания — для приготовления алкогольных и безалко-

гольных напитков, а также при изготовлении сыра. Со временем «технологические инструменты» в виде мутировавших и специально подбираемых микроорганизмов становились все сложнее, а с открытием в начале 1970-х гг. рекомбинантной ДНК (рДНК) этот процесс перешел на качественно иной уровень. Сотни (если не тысячи) лет человек видоизменял животных и растения путем скрещивания и селекции, то есть отбора пород животных и сортов растений с «полезными» свойствами и выбраковки тех из них, свойства которых оказываются нежелательными. В основе современной биотехнологии лежит возможность осуществления сложных и точных манипуляций с генетическим материалом жизнеспособных организмов. Биотехнология позволяет целенаправленно усиливать способность организма к продуцированию того или иного химического соединения (например, вырабатываемого грибами пенициллина), к исключению той или иной реакции (например, продуцирования этилена клетками растений) или к продуцированию совершенно нового продукта (например, химозина микроорганизмами).

Многие потребляемые нами пищевые продукты получают (а еще большее их количество можно получать) с использованием методов биотехнологии. С их помощью можно повышать пищевую ценность агропромышленных культур, изменять текстуру, цвет, вкусоароматические свойства, продлевать сезон выращивания, повышать урожайность, получать устойчивые к заболеваниям и вредителям растения, а также менять многие другие показатели. Трансгенные методики можно использовать также для улучшения характеристик роста, состояния и других полезных качеств сельскохозяйственных животных. Ферментные препараты, полученные при помощи рДНК, широко используют в производстве сыра, для замедления черствения хлеба, а также в производстве фруктовых соков и виноделии.

18.3. Краткий исторический экскурс

Земледелие известно еще со времен натуфийской культуры* в долине реки Иордан. Примерно в те времена человек сознательно бросил в землю зерна дикого тогда ячменя (*Hordeum spontaneum*), названного позднее полбой или «пшеницей однозернянкой» (*Triticum monococcum L. ssp. boeoticum*), что положило начало прекращению эпохи собирательства. В результате этой «неолитической революции» общество охотников и собирателей начало переходить к оседлому образу жизни, что позволило теперь уже крестьянам культивировать растения и собирать урожай. С тех давних пор человек, привлекая все более и более сложные технологии, имеет дело с окультуренными растениями, а с более поздних времен — и домашними животными. Так, например, современная кукуруза мало похожа на своего дикорастущего предка — растения, родственного теосинте (*Zea mexicana*). Благодаря всего трем крупным мутациям она получила селективное преимущество, сделавшее эту культуру привлекательной для земледельцев, но оказавшееся губительными для его выживания в дикой природе. Существует мнение, что современные генно-модифицированные организмы, полученные с использованием методов генной инженерии, представляют собой новую, еще большую опасность для окружающей среды или здоровья человека, однако эти мнения научно не подтверждены и не поддерживаются научным сообществом.

С научной точки зрения ни понятие «генетически (генно-) модифицированный организм» (ГМО), ни «жизнеспособный модифицированный организм» (ЖМО) точно не описывают продукты современной биотехнологии, поскольку фактически все виды окультуренных растений и одомашненных животных являются в той или иной степени модификациями (рис. 18.1). В XX веке средства, используемые селекционерами для генетических манипуляций, вышли далеко за пределы традиционного перекрестного скрещивания. В частности, растениеводы применяют анеуплоидию, диплоидию, технику эмбрионального спасения**, слияние протопластов, сомаклональную селекцию, культуру пыльников, мутационную селекцию с облучением (^{60}Co) или с применением этилметансульфаната [9]. Несмотря на то что современная хлебопекарная пшеница (*Triticum aestivum*) является природным гексаплоидом из трех исходных

* Натуфийская культура — культура мезолита, существовавшая в X–VIII тысячелетиях до н. э. главным образом на территории исторической области Палестины, а также частично на территории современных Сирии и Южной Турции. — *Примеч. ред.*

** Техника, используемая при скрещивании неродственных видов растений, направленная на недопущение кроссинговера между неродственными хромосомами. — *Примеч. ред.*

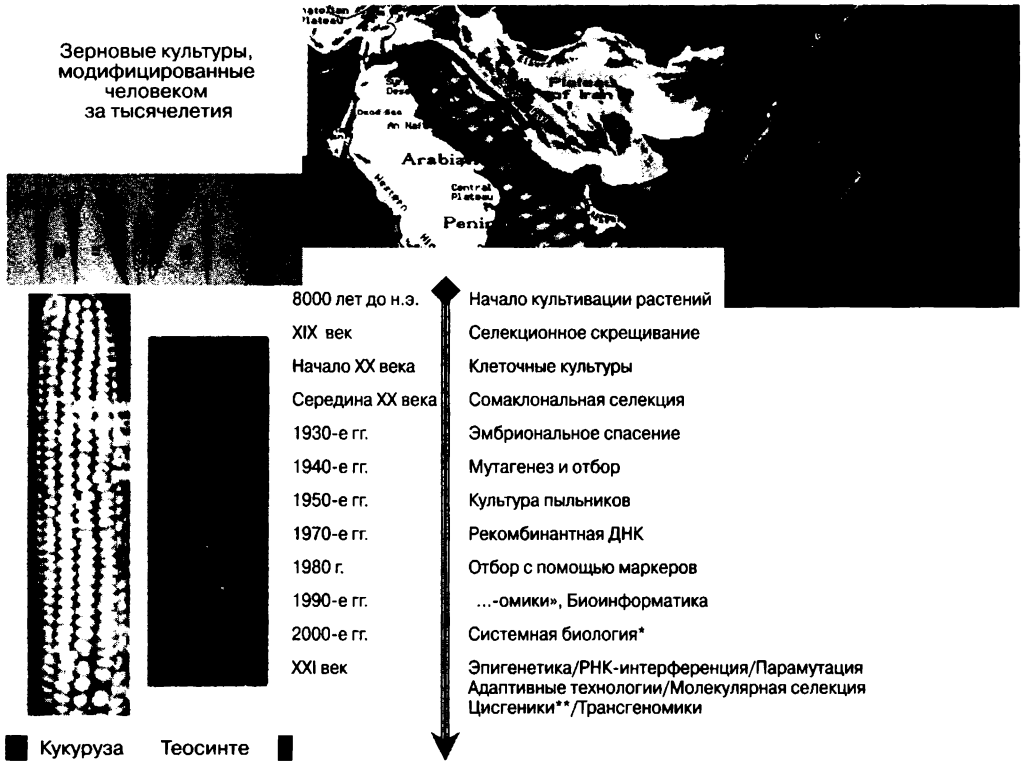


Рис. 18.1. Сверху на карте показаны места, где по современным представлениям зародилась сельскохозяйственная цивилизация (плодородные земли Месопотамии между реками Тигр и Евфрат на территории современного Ирака). Тетраплоидные и гексаплоидные сорта пшеницы ведут свое начало именно оттуда, о чем свидетельствуют антропологические и геномные исследования. Этими же методами было установлено, что современная кукуруза ведет свое начало от дикорастущего растения теосинте, произрастающего в Латинской Америке. В верхней правой части рисунка приведен фотоснимок современной японской селекционной станции для радиационного выведения новых сортов растений, а на временной шкале — время появления (в том числе и в перспективе) различных технологий модификации видов

генов, отобранных древними земледельцами, их родственница-тетраплоид (пшеница дурум), из которой готовят итальянскую пасту, претерпела радиационный мутагенез с отбором случайных модификаций различных характеристик крахмала и клейковины (глютена), влияющих на качество макаронных изделий. Аналогичным образом были получены современные азиатские груши, стойкие к поражению черной грибковой пятнистостью (вероятно, путем разрушения гена, игравшего существенную роль в этих патогенных процессах).

Отличительной особенностью всех вышеуказанных методов является неспособность контролировать изменения на уровне генома, так как у растения сотни тысяч генов, а процесс их смешивания и отбора неточен, случаен и неконтролируем. Кроме того, традиционные способы выведения сортов и видов растений требуют огромных затрат времени и труда и сводятся в основном к переносу генов между близкородственными растениями. Идентификация «потомков», несущих в себе характерный ген, в значительной степени основывается на схемах селекции, и для устранения нежелательных последствий требуется обычно 7–12 поколений. Растения, выведенные традиционными фенотипическими способами селекции для реализации на рынке или просто возделывания в естественной среде, не подлежат предварительной (до их выхода на рынок) оценке безопасности для здоровья человека или состояния окружающей среды.

---

* Научная дисциплина, образовавшаяся на стыке биологии и теории сложных систем. Впервые этот термин был использован в 1993 г в статье *W. Zieglgänsberger* и *T. R. Tölle*. — *Примеч. ред.*

* Цисгеники — это ГМО, полученные в результате манипуляций с собственной ДНК организма или близкородственных видов без использования ДНК из чужеродных источников. — *Примеч. ред.*

Вместе с тем, благодаря огромному массиву данных о геноме различных видов растений, микроорганизмов, земноводных, птиц и млекопитающих можно говорить о генетическом сходстве организмов, относящихся к филогенетически отдаленным видам. Например, некоторые последовательности ДНК *E. coli* идентичны аналогичным последовательностям ДНК растений, земноводных, птиц и млекопитающих (в том числе человека). Эти факты ставят под сомнение возможность закрепления тех или иных генов за определенными видами, то есть перестановка желательных генов от одного вида к другому с использованием рДНК-технологий не обязательно будет связана с риском для окружающей среды и здоровья человека.

18.4. Общие сведения о биотехнологиях

Большинство основных технологий, подпадающих под понятие «биотехнология», хорошо известны — это полимеразная цепная реакция (ПЦР), технологии микроматриц (биочипов) и рибозимов, РНК-сайленсинг, геномика, протеомика, метаболомика и биоинформатика, а также маркерная селекция. Перед тем, как перейти к их более подробному описанию, следует вкратце охарактеризовать некоторые основные инструменты биотехнологических исследований.

18.4.1. Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК включает в себя несколько этапов:

обнаружение гена, отвечающего за синтез требуемого белка;

изоляция этого гена при помощи рестрикционных ферментов (рестриктаз);

перемещение гена с соответствующими сигналами экспрессии для трансформации на подходящую молекулу ДНК (вектор);

перенос рДНК в организм хозяина и трансформация его генома.

Последний этап включает выбор трансформанта с требуемыми свойствами и его последующее клонирование.

Клонирование *in vivo* может быть выполнено в таких одноклеточных прокариотах, как *E. coli*,, в одноклеточных эукариотах типа дрожжей, а также в клетках растений и млекопитающих, выращиваемых в тканевой культуре (вне организма, методом эксплантации). В любом случае рДНК должна быть получена клеткой в той форме, в которой ее можно реплицировать и экспрессировать, что обеспечивается включением ДНК в векторную молекулу.

В качестве векторов можно использовать определенные вирусы, но в случае с микроорганизмами клонирование проводят преимущество с помощью плазмиды или так называемой искусственной бактериальной хромосомы, которая, как и вектор, может вместить длинную последовательность. Плазмиды — это присутствующие в бактериях молекулы ДНК, существующие отдельно от хромосом. Они относительно невелики (всего несколько тысяч пар оснований) и обычно несут всего один или несколько генов. Плазмиды имеют кольцевую форму и всего одну точку начала репликации. Плазмиды реплицируются по тому же механизму, что и хромосома хозяйской бактериальной клетки. Некоторые плазмиды воспроизводятся с той же скоростью, что и хромосомы (рис. 18.2), так что у одной клетки будет лишь одна копия плазмиды, тогда как другие копируются быстрее, и одна клетка может получить их более 50. На плазмиды с большим количеством копий обычно экспрессируется больше генов. В природе эти гены зачастую кодируют информацию о белках (например, о ферментах), защищающих бактерию от одного или нескольких антибиотиков (во многих случаях они являются своего рода вирулентными и токсикогенными кассетами генов).

18.4.2. Полимеразная цепная реакция

Основным методом амплификации ДНК-мишеней, используемых, например, для выявления в пищевых продуктах посторонних примесей, остается полимеразная цепная реакция (ПЦР). В ходе ПЦР два коротких, химически синтезированных фрагмента ДНК (так называемых праймеров) гибридизируются с ДНК, которая затем амплифицируется в повторяющемся цикле реакций (рис. 18.3). До концентраций, достаточных для обнаружения методами гель-электрофореза и окрашивания, амплифицируются очень

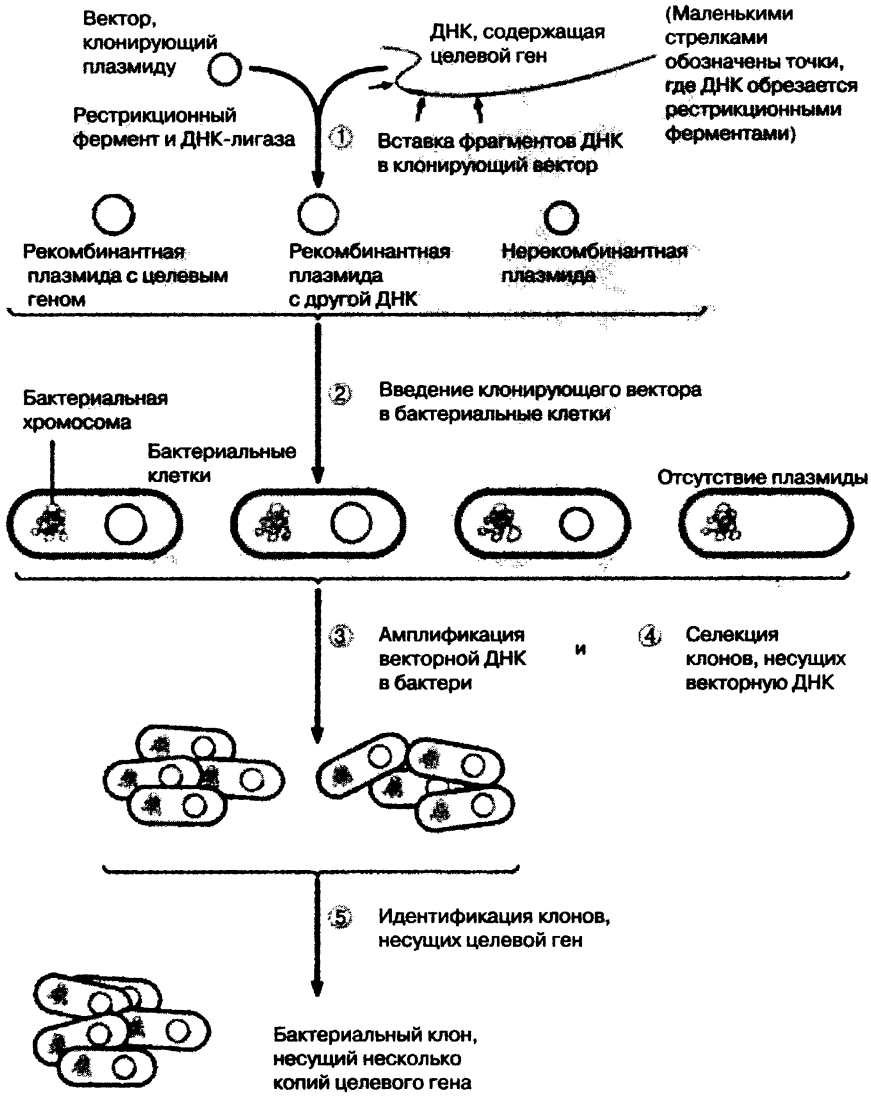


Рис. 18.2. Плазмиды достаточно легко проникают в бактериальную клетку. Это наблюдается в природе и может быть причиной быстрого распространения стойкости к антибиотикам в лечебных заведениях. В лабораторных условиях плазмиды можно намеренно вводить в бактериальную молекулу, модифицируя клетку генами, встроенными в плазмиду

небольшие количества ДНК. Зачастую для проведения реакций гибридизации и ПЦР требуется создать такие условия, чтобы для одной ДНК-последовательности или семейства связанных последовательностей можно было провести тест с использованием одного и того же зонда или праймера.

18.4.3. Микроматрицы ДНК

В 1991 г. фирмой *Affymetrix* были разработаны микроматрицы ДНК (биочипы) для промышленного использования, представляющие собой результат «массивно-параллельной» геномной технологии (рис. 18.4) [67]. Эта технология позволяет существенно ускорить одновременный анализ тысяч генов и является очень мощным инструментом познания внутренней структуры организмов, в том числе анализа экспрессии генов, распознавания генетических вариаций, открытия новых генов, а также генетического фингерпринтинга (снятия своего рода «отпечатков пальцев») и разработки новых диагностических методов.

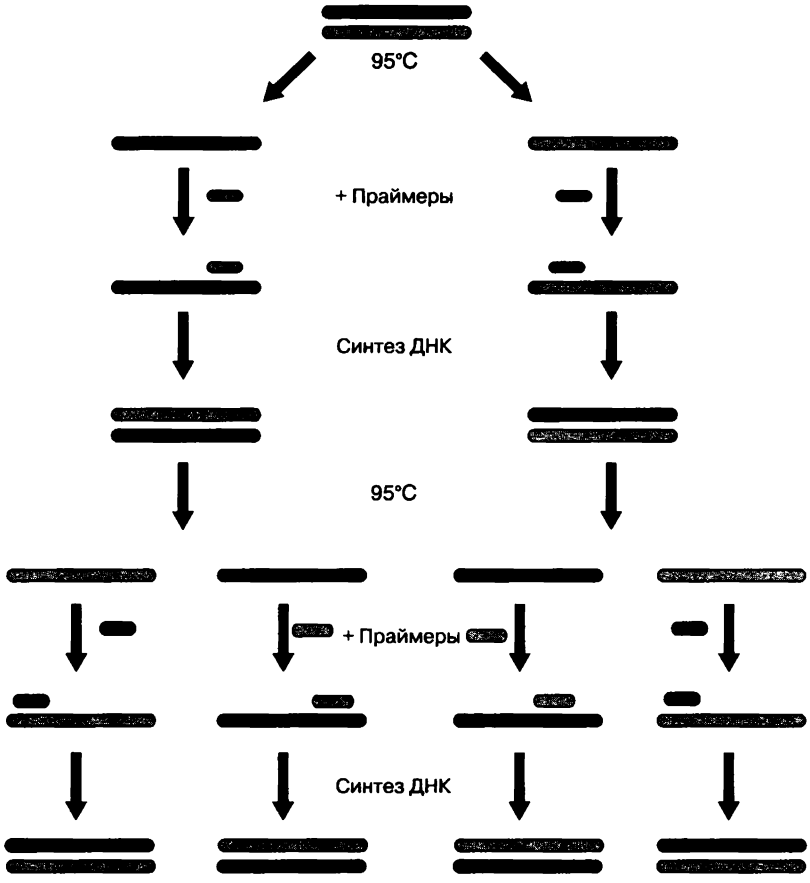


Рис. 18.3. Для осуществления ПЦР необходимо идентифицировать подлежащую воспроизведению часть последовательности ДНК. Для этого синтезируют праймеры (короткие олигонуклеотиды, содержащие около 20 нуклеотидов), которые точно дополняют последовательность 3'-конца каждой нити целевой ДНК (ДНК-мишени). Для выделения этих нитей контрольную ДНК нагревают и смешивают с праймерами, которые связываются с комплементарными для них последовательностями ДНК. Реакционная смесь должна содержать все четыре деоксинуклеотид-трифосфата (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) и термостабильную ДНК-полимеразу (*Taq*-полимеразу). Сначала происходит синтез 5' → 3', в котором в качестве матрицы используется оригинальная нить. Затем полимеризацию продолжают до тех пор, пока каждая из вновь синтезированных нитей не увеличится настолько, что охватит весь сайт, распознанный другим праймером. Получаются две молекулы ДНК, идентичных оригинальной молекуле. Вновь синтезированные молекулы также являются матрицами, их последовательно нагревают до выделения нитей, и процесс повторяется. За каждый цикл дублируется определенное число молекул ДНК. При использовании автоматизированного оборудования каждый цикл репликации занимает менее 5 мин. Через 30 циклов образуется более миллиарда копий одной молекулы ДНК ($2^{30} = 1{,}07 \cdot 10^9$)

Это позволило ученым проводить масштабный анализ экспрессии генов, прогнозировать, как будут развиваться организмы в дальнейшем и реагировать на различные внешние стимулы. Такие методы особенно эффективны, когда требуется получить общую картину скоординированной экспрессии различных генов. Подобные биочипы нашли широкое применение и используются во многих областях фундаментальных и клинических исследований (в том числе для изучения мутаций, придающих инфицированным организмам устойчивость к лекарственным препаратам). Так, например, эти технологии используются при непосредственном сравнении ДНК-последовательностей в больших сегментах генома человека, при отслеживании поведения генов человека в мутациях, связанных с онкологическими заболеваниями, при количественном и параллельном измерении экспрессии иРНК тысяч генов, а также при физическом и генетическом картировании организмов.

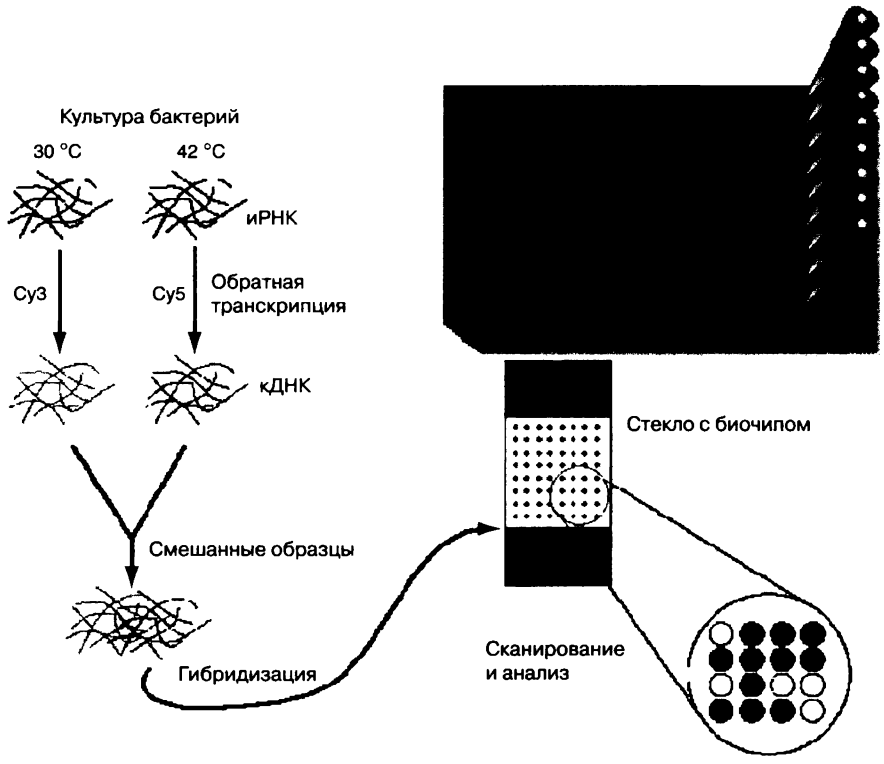


Рис. 18.4. Технология микроматриц (биочипов), позволяющая одновременно анализировать десятки тысяч генов. Анализ проводят с использованием стекол или чипов. Из целевой клетки (клетки-мишени) выделяют все иРНК, превращают их в комплементарные ДНК (кДНК), метят флуоресцентным красителем и помещают в биочип. Различные молекулы ДНК прикрепляются к соответствующим им генам. Аналогичную процедуру осуществляют и на контрольной группе клеток, помеченных другим флуоресцентным красителем. Биочип сканируют лазером и анализируют интенсивность окрашивания в разные цвета, что позволяет получить информацию по каждому гену. При высокой активности тот или иной ген дает множество молекул иРНК, которые гибридизируются с ДНК на биочипе, что дает область очень яркого флуоресцентного окрашивания. Менее активные гены дают меньше иРНК, и их окрашивание слабее. При отсутствии окрашивания ни одна из иРНК не гибридизировалось с ДНК, что свидетельствует о неактивности данного гена. Данный метод используется для анализа активности различных генов в определенных ситуациях.

18.4.4. Антисмысловая технология

В антисмысловой технологии используется естественное сродство нуклеиновых кислот. При кодировании гена для целевого генома противоположной ориентации противоположная нить РНК ренатурируется и блокирует экспрессию фермента. Применение этой технологии (рис. 18.5) в растениеводстве запатентовано фирмой *Calgene* — именно с ее помощью были созданы знаменитые томаты *FLAVR SAVR*.

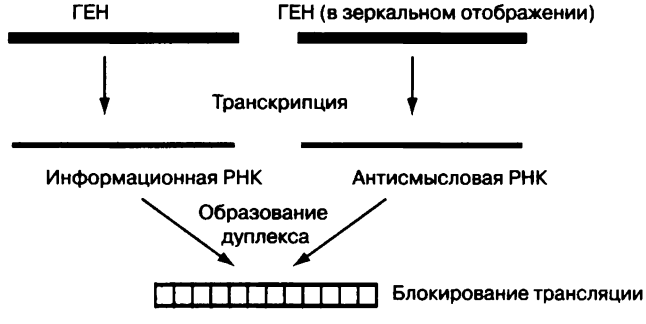


Рис. 18.5. Антисмысловая технология. РНК, как и ДНК, способны образовывать дуплексы. Словом ГЕН на рисунке обозначен транскрипт плюс цепи РНК, а его зеркальное отображение — это транскрипт комплементарной нити ДНК с такой РНК, последовательность оснований которых комплементарна относительно к первой нити. Вторую нить называют антисмысловой, поскольку ее последовательность нуклеотидов является смысловым комплементом. Когда иРНК формирует дуплекс с комплементарной смысловой иРНК, трансляция блокируется

18.4.5. Рибозимы

Рибозимы — это РНК-ферменты. Несмотря на то что доминирующей формой биокатализаторов в современных клетках являются ферменты, существует не менее восьми природных РНК-ферментов (рибозимов), катализирующих фундаментальные биологические процессы. Предполагается, что рибозимы — это остатки какой-то древней формы жизни, которая полностью регулировалась РНК. В целом рибозимы — это катализирующие молекулы РНК, способные расщеплять себя и другие целевые РНК, и поэтому они могут оказаться полезны в качестве контрольной системы для выключения генов или вирусов-мишеней (рис. 18.6) [12]. Возможность получения рибозимов, расщепляющих любую целевую РНК, делает их ценным инструментом как для фундаментальных исследований, так и для лечения заболеваний. С недавних пор рибозимы используют в исследованиях трансгенных животных, при валидизации генов-мишеней и изучении метаболических путей, однако до сих пор не решена задача доставки рибозимов к соответствующей части клетки с целевой РНК.

18.4.6. Рибопереключатели

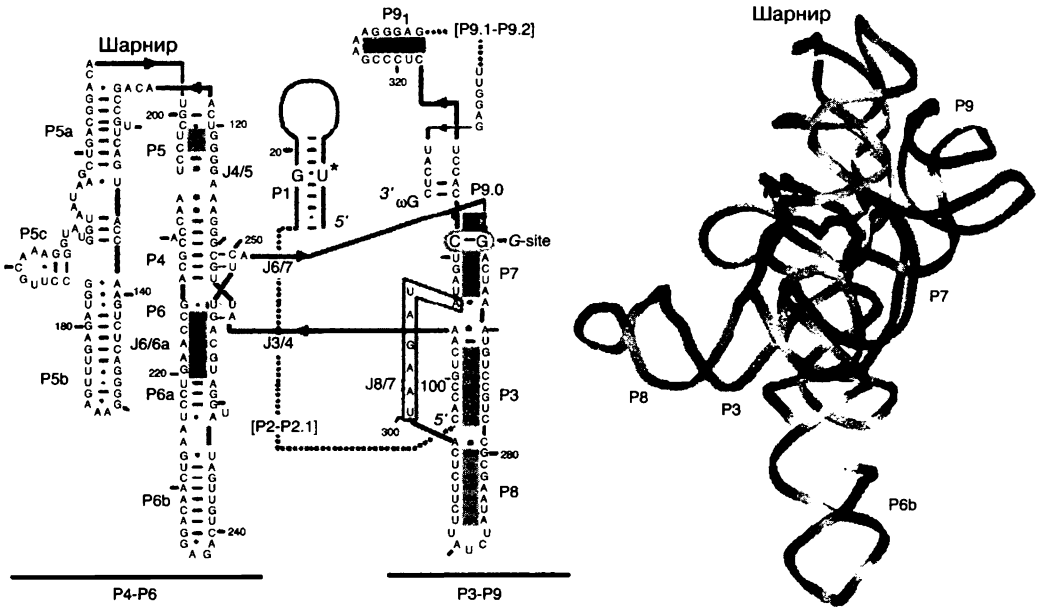
Каждая клетка в зависимости от меняющихся условий окружающей среды или своего состояния должна регулировать экспрессию сотен различных генов. Большую долю этого генетического контроля выполняют белки, контролирующие метаболиты и другие химические стимулы путем выборочного связывания с мишенью. В работе [56] было подтверждено, что РНК может также выполнять функции своего рода генетических переключателей, контролирующих фундаментальные биохимические процессы.

Рибопереключатели с помощью нетранслируемой последовательности в иРНК осуществляют естественный генетический контроль, формируя для метаболита, регулирующего экспрессию данного гена, антигенсвязывающий «карман». В перспективе генно-модифицированные рибопереключатели смогут выполнять функции необходимого генетического контроля.

18.4.7. РНК-сайленсинг

Получение пищевых продуктов с желаемыми свойствами (например, зерновых с повышенным содержанием белка, овощей и фруктов с оптимизированной пищевой ценностью), а также цветов с более яркой окраской представляется весьма привлекательной перспективой. Именно с цветами было связано открытие удивительного и очень ценного для науки явления. Пытаясь создать «черные» петунии как модель для «черной розы» (мечты любого флориста) ученые из Калифорнийского Университета (г. Дэвис) предприняли попытку сверхэкспрессировать ген синтеза халкона путем введения модифицированной копии при сильном промоторе [48]. В результате этого эксперимента ученые к своему удивлению получили белые цветы и множество их цветных вариантов — от фиолетовых до белых. Это стало первым доказательством того, что в настоящее время получило название посттранскрипционного умолкания (сайленсинга) генов (*PTGS*). Поначалу этот странный феномен связывали исключительно с петуниями и некоторыми другими видами растений, однако в настоящее время РНК-сайленсинг стал одним из самых популярных направлений в молекулярной биологии. РНК-интерференция (*RNAi*) у животных и в базальных тельцах эукариотов, подавление генов у грибов, *PTGS* у растений — все это примеры масштабного феномена, получившего общее название «РНК-сайленсинг» [38, 68]. Помимо вышеперечисленных проявлений он играет определенную роль в защите организмов от вирусов и в механизме транспозонного мутагенеза. Наиболее значительным достижением можно считать начало использования *PTGS* (и, в частности, *RNAi*—*PTGS* после появления двухнитевой РНК, днРНК) как инструмента подавления экспрессии конкретных генов у самых разных организмов.

Как же работает этот механизм и как его можно использовать в экспериментах в области функциональной геномики и для селективной модификации экспрессии генов? Вместо продуцирования большого количества новых белков высокоэкспрессивные трансгены могут заблокировать экспрессию собственных генов растения, запустив сайт-специфическую деструкцию аналогичных транскриптов (рис. 18.7) [21]. Таким образом, после достижения очень высокой концентрации в цитоплазме трансгенного транскрипта (иРНК) трансген перестает подавлять экспрессию — как свою собственную, так и аналогичных эндогенных генов. Этот непреднамеренный «сайленсинг РНК» можно использовать в целях предотвра-



Принцип действия рибозима — молекулярные ножницы

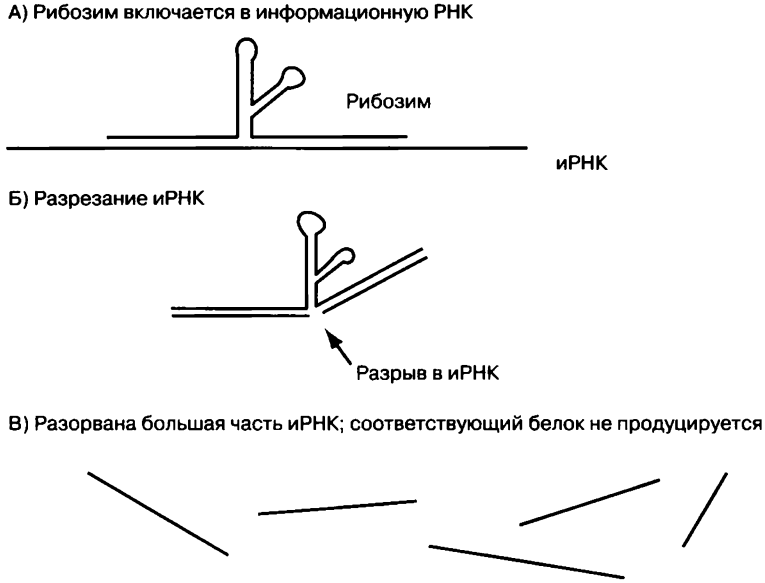


Рис. 18.6. Механизм действия рибозима. Сверху показан сформированный активный сайт в кристаллической структуре рибозима тетрахимены (*Tetrahymena*). РНК участвует во внутримолекулярном катализе, в том числе в самосплайсинге («самосшивке»), а в некоторых случаях выступает в качестве фермента. К самосплайсингу способны самые разные молекулы в рРНК и некоторые молекулы иРНК (хлоропластовые и митохондриальные). Эти молекулы называют рибозимами, и некоторые из них проявляют другие ферментативные свойства. По [11]

щения нежелательной экспрессии, а самим растением он используется для блокирования синтеза белка РНК-содержащими вирусами. Вполне вероятно, что сайленсинг играет свою роль в защите генома, поскольку увеличивается мобильность транспозонов, подвергнутых РНК-сайленсингу (это показано у дефектных мутантов одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*; кроме того, у *Drosophila melanogaster* транспозиция ДНК в результате РНК-сайленсинга подавляется) [7, 15].

РНК-сайленсинг может влиять и на растение в целом, но чаще всего подавляются гены в тех упорядоченных структурах, которые наследуют морфологию растения, то есть считается, что они отражают когда-то существовавшую модель транскрипции трансгенов. В некоторых образцах такая косупрессия генов не является автономной для клетки и может передаваться от клетки к клетке (возможно, и по всему организму растения).

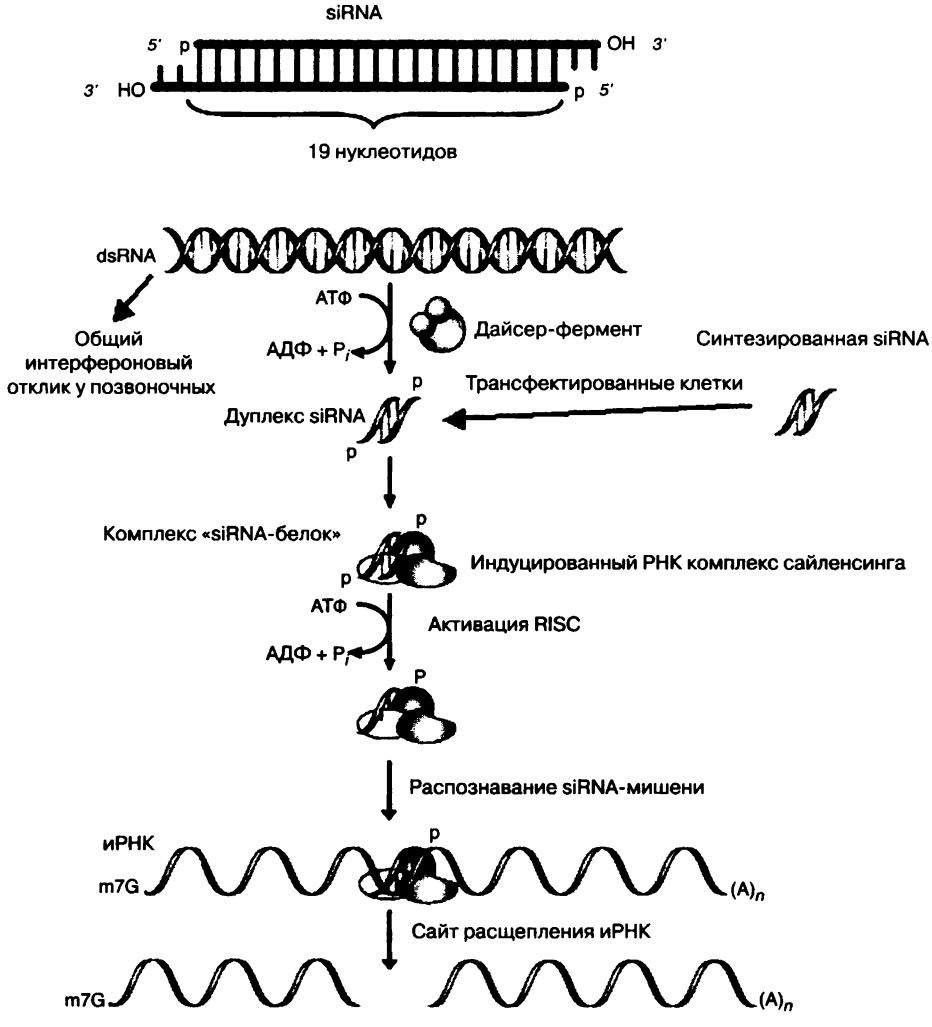


Рис. 18.7. Схема РНК-интерференции. Как только иРНК оказывается расщепленной интерференционной РНК (*RNAi*), поскольку концы иРНК не защищены 5'-«головой» и 3'-поли(А)-хвостом, свободные концы этих двух фрагментов иРНК быстро распадаются под воздействием клеточных РНК-ферментов: siRNA — малая интерферирующая РНК. По [20]

18.4.8. Генная инженерия белка

Весьма перспективной областью генной инженерии представляется инженерия белка, с помощью которой можно разрабатывать и получать новые белковые структуры, позволяющие улучшить свойства ферментов или заставить их действовать иначе. Основными методами инженерии белка являются:

сайт-направленный мутагенез;

метод случайных мутаций и отбора;

метод направленного развития (улучшенный вариант предыдущего метода).

Большая часть работ в области белковой инженерии посвящена изучению строения, функции и механизмов действия ферментов, отобранных по их физиологической значимости и/или простоте получения, а не с точки зрения перспектив их промышленного производства. Вместе с тем по мере того, как на первый план выходят проблемы экологичности производства пищевых продуктов, акценты постепенно смещаются.

Наиболее распространенный и простой метод улучшения действия, специфичности, а также создания новых ферментов — это постепенная замена одного-двух аминокислотных остатков в общей структуре белка (рис. 18.8 и 18.9) [14]. Несмотря на то что в настоящее время существует и постоянно совершенствуется обширная база данных, объединяющая информацию о строении и пространственной структуре ферментов, пока что невозможно точно предсказать трехмерные изменения молекулы белка в результате подобной замены. Основной проблемой остается оценка долгосрочного воздействия на новую структуру, в том числе на ее взаимодействие с растворителями. Результаты многих исследований подтверждают, что современная наука способна объяснить уже произошедшую структурную замену аминокислотных последовательностей, но точно предсказать ее изменение она не может. Тем самым генная инженерия белка в настоящее время является во многих отношениях случайным процессом. Очевидно, что сравнительно небольшие изменения в последовательностях аминокислот могут повлечь за собой большие конформационные изменения и даже повлиять на скорость-определяющую стадию ферментативного катализа. При этом можно предположить, что дальнейшее совершенствование баз данных, детализация информации о ферментах и применение для расчетов новейшего программного обеспечения значительно повысят вероятность успеха генной инженерии белка, а полученные результаты найдут применение в промышленных ферментативных технологиях.



Рис. 18.8. Цикл инженерии ферментов начинается с выделения и определения характеристик конкретного фермента. Затем эта информация анализируется по базе данных об известных и предполагаемых результатах замены аминокислотных остатков с возможным получением фермента с улучшенной структурой. Этот синтетический фермент создается путем сайт-направленного мутагенеза, после чего его изолируют и описывают. Как удачные, так и неудачные результаты заносятся в базу данных, и процесс повторяют до достижения нужного результата. По [13]

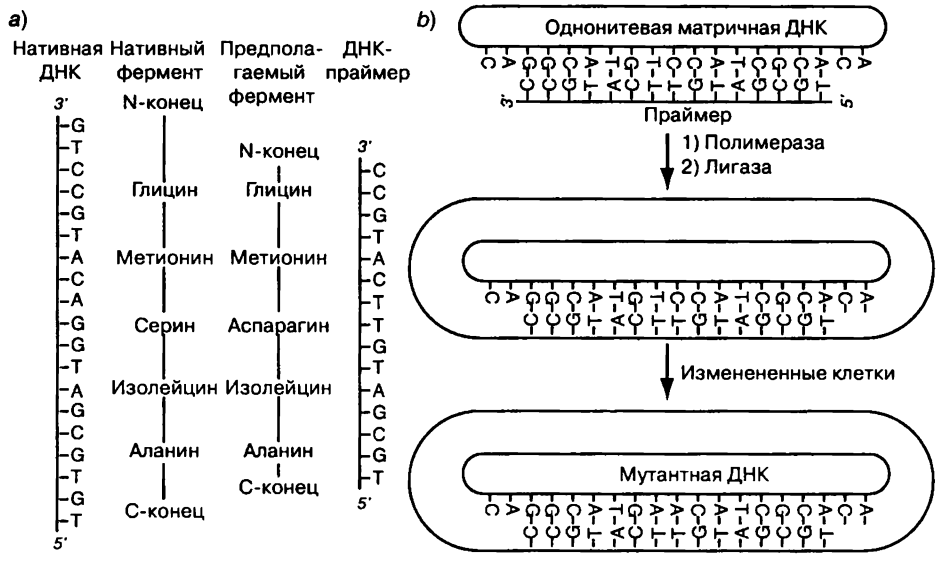


Рис. 18.9. Сайт-специфический мутагенез: *a* — синтезируется короткий участок ДНК (праймер), комплементарный по участку гена-мишени за исключением сайта мутации; *b* — олигонуклеотидный праймер соединяется с копией однонитевого гена и дополняется ферментами и нуклеотид-трифосфатами, образуя двухнитевой ген. После репродукции этот ген дает как клоны-мутанты, так и клоны дикого типа. Мутантную ДНК можно выявить путем гибридизации с радиоактивно меченными олигонуклеотидами комплементарной структуры. По [13]

18.4.9. Геномика и протеомика

Функциональная геномика — это поиск связей между экспрессией генов и функциями клетки. В ткани одного типа содержатся тысячи генов, степень экспрессии которых различается в зависимости от стадии развития организма, его состояния, последовательности событий и изменений условий окружающей среды. Функциональная геномика изучает гены и их роль в организме. Хотя результаты этих исследований применяются в основном в медицине, данное направление в настоящее время постепенно распространяется и на сельскохозяйственные биотехнологии, особенно на исследования в области биотехнологии растений.

Протеом — это совокупность всех белков организма, экспрессированных из генома и модифицированных. Протеомика изучает структуру, функции, местоположение и взаимодействие белков как внутри клетки, так и в межклеточном пространстве. Протеомика основывается на результатах общего анализа экспрессии и интерференции генов с использованием данных о последовательностях ДНК, то есть это область очень сложных многоплановых исследований. Каждая клетка продуцирует тысячи белков, каждый из которых выполняет свою особую функцию. Белки существенно отличаются друг от друга даже в одном организме, но их молекулы ДНК во многом сходны. Кроме того, в отличие от неизменного генома протеом организма настолько динамичен, что возможно практически бесконечное количество комбинаций белков. Геном постоянен и не зависит от типа клетки и ее возраста, а протеом меняется от ткани к ткани, от клетки к клетке и зависит от возраста и времени. Состояние клеточного протеома зависит также от состояния других клеток организма и от стимулов внешней среды. В одном гене может храниться код для различных вариантов белка, каждый из которых будет выполнять свою функцию. В протеомике применяются технически сложные методы анализа профилей белков и каталогизации межбелковых взаимодействий на уровне генома, которые постоянно совершенствуются (особенно в области изучения микроорганизмов). Функциональная геномика оказывает влияние на многие сферы биологии — от фундаментальной биохимии до улучшения качества и генетической модификации сельскохозяйственных растений, усиления защиты от патогенов и повышения эффективности полезных микроорганизмов.

18.4.10. Биоинформатика и метаболомика

Секвенирование геномов бактерий, растений и человека предоставило ученым огромное количество данных, которые с трудом поддаются изучению и осмыслению. Если говорить, например, о последовательности генома человека, то распознать в нем отдельные гены очень сложно. Аналогичные проблемы возникают и в других исследованиях по структурной и функциональной геномике (прежде всего из-за параллельности научных подходов).

Создание реляционных баз данных, разработка эффективных методов исследований и анализа полученных данных положили начало новой научной дисциплине, получившей название «*биоинформатика*». В самом общем виде биоинформатика — это применение в биологии вычислительных или алгоритмических методов, позволяющих получать, систематизировать и анализировать информацию, оперируя большим объемом данных. Например, это прогнозирование структуры белков, динамическое моделирование сложных физиологических систем и статистический анализ количественных признаков в популяциях в целях определения генетической общности этих признаков. В настоящее время биоинформатика является неотъемлемой частью исследований ДНК с применением методов структурной и функциональной геномики, структурного моделирования, поиска связей и копирования структур высшего уровня (например, путей активации метаболических и неврологических процессов).

Эволюция биотехнологических методов и переход в «постгеномную эру» позволят человеку значительно усовершенствовать возможности собственного организма и повысить способность к адаптации в изменяющихся условиях внешней среды. Одна из таких областей, находящаяся в центре внимания ученых и призванная обеспечить здоровье человека, — это выявление (и разработка) оптимальных режимов питания и рационов для конкретного человека с учетом его уникальных генетических характеристик. Эта область науки получила название *нутригеномики* и представляет собой моделирование сложных взаимодействий между рационом человека и его генами в целях создания «персонифицированной» модели питания, обеспечения оптимального для данного человека состояния здоровья и продолжительности жизни, а также для разработки диетических рекомендаций, связанных с генотипом человека. Все это призвано помочь профилактике заболеваний, облегчить их течение и возможное лечение, причем подверженность человека тем или иным заболеваниям можно будет определить средствами метаболомики. *Метаболомика* использует аналитические методы, позволяющие создавать профили метаболитов, то есть химических соединений, обнаруживаемых в биологических образцах. В отличие от методов целевого анализа метаболомика не дискриминантна в том смысле, что для нее не требуются знания о каждом представленном веществе. Возможность получить знания о метаболизме каждого отдельного организма будет по своим последствиям революционным прорывом, поскольку с помощью питания можно будет корректировать состояние здоровья человека, — аналогичным образом знание геномики коренным образом может изменить лекарственную терапию. Тем не менее, эти области науки находятся пока что в самом начале своего становления, и их цели и инструменты лишь формируются.

18.5. Промышленная биотехнология. Ферменты, пищевые продукты и корма для животных

В современной промышленности (в производстве пищевых продуктов, в зернопереработке, в производстве тканей, бумаги, целлюлозы и отдельных химических веществ) современные методы молекулярной биологии используются для повышения эффективности производства и снижения вредного влияния промышленных процессов на окружающую среду.

Еще задолго до появления современной биотехнологии ферменты играли большую роль в производстве пищевых продуктов. Они использовались, например, в производстве сыров, хлеба и алкогольных напитков. Ферменты — неотъемлемая часть современной пищевой промышленности, где они выполняют самые разные функции. Их используют практически во всех подотраслях пищевой промышленности, в том числе в зернопереработке, молочной, сахарной и мясоперерабатывающей промышленности, в пивоварении, виноделии и в производстве соков.

Использование ГМО в производстве ферментов дает ряд преимуществ, а именно:

возможность получать высокоочищенные ферменты с максимальной специфичностью действия;

возможность получать ферменты, производство которых иным способом невозможно по экономическим, экологическим и токсикологическим причинам;

снижение энергопотребления и количества отходов благодаря высокой эффективности производства; в пищевой промышленности — повышение эффективности использования сырья (например, в производстве соков), качества готовой продукции и увеличение срока годности, что позволяет снизить количество пищевых отходов (в частности, в кондитерской и хлебопекарной промышленности) и сократить использование химических веществ (в частности, в крахмально-паточной промышленности); в производстве кормов применение ферментов позволяет снизить загрязнение окружающей среды фосфором, высвобождающимся из отходов животноводства.

На пищевых производствах ферменты и ферментные препараты практически всегда используются как технологические добавки. В готовом продукте они либо отсутствуют, либо не функциональны. В последние 15–20 лет появилось множество пищевых ферментов, полученных с использованием ГМО — например, химозин (молокосвертывающий фермент). Химозин, зачастую называемый также реннином (сычужным ферментом) — это протеолитический фермент, синтезируемый в желудке. Его роль в процессе пищеварения заключается в свертывании молока в желудке, что очень важно для детенышей млекопитающих. Если бы молоко не свертывалось, оно быстро проходило бы через желудок, и его белки не усваивались бы. Химозин эффективно свертывает жидкое молоко и тем самым дольше задерживает его в желудке. Секреция химозина максимальна в первые дни после рождения и впоследствии снижается, сменяясь секрецией пепсина — основной желудочной протеазы. Химозин секретируется неактивным профферментом — прохимозином, который, как и пепсин, активируется под воздействием кислоты. Химозин подобен пепсину в том смысле, что он наиболее активен в кислых средах.

Основным молочным белком является казеин. Различают четыре основных вида его молекул: α_{s1}, α_{S2}, β и к. Альфа- и бета-казеины — это гидрофобные белки, легко осаждающиеся под действием кальция (в норме содержание кальция в молоке значительно выше количества, необходимого для осаждения этих белков). У каппа-казеина совершенно другая молекула, не осаждаемая кальцием. Химозин протеолитически расщепляет и превращает каппа-казеин в *пара*-каппа-казеин и небольшую молекулу макропептида. *Пара*-каппа-казеин не способен стабилизировать мицеллярные структуры, и казеины, нерастворимые в растворе солей кальция, осаждаются с образованием сгустка.

Поскольку телячий химозин довольно дорогой, методами генной инженерии получают микроорганизмы, которые продуцируют химозин, идентичный ферменту, вырабатываемому в желудке жвачных животных. Генно-модифицированный химозин ведет себя аналогично телячьему химозину, при этом его действие более предсказуемо и в нем меньше посторонних примесей. Такой химозин применяют в сыроделии для получения высококачественных сыров без использования плесневых ферментов, а также сычужного фермента других животных (не телячьего). Химозин, полученный из рекомбинантных микроорганизмов, соответствует более строгим требованиям и подвергается серьезной проверке на чистоту. В настоящее время в США и Великобритании около 90% всех твердых сыров изготавливают с применением химозина, полученного из генно-модифицированных микроорганизмов. Его легче очистить, он более активен (95% по сравнению с 5% у натурального химозина), а его получение обходится дешевле (рис. 18.10) [60]. В 1988 г. химозин стал первым генно-модифицированным ферментом, разрешенным в Великобритании к использованию в пищевых продуктах, а в 1990 г. он был разрешен и в США. Тем самым в Великобритании применение ГМО в пищевой промышленности было разрешено на два года раньше, чем в США. В настоящее время в США и в большинстве европейских стран разрешены к применению три таких фермента, одобренных национальными обществами вегетарианцев, а также разрешенных в производстве кошерных и халяльных продуктов.

Существуют прогнозы, согласно которым в будущем практически все пищевые ферменты будут получать с использованием генно-модифицированных организмов. В настоящее время до 90% ферментов, получивших широкое промышленное применение, являются результатом использования технологии рекомбинантных ДНК. Помимо пищевой промышленности ферменты все чаще используют в химическом синтезе. В отличие от неорганических катализаторов (кислот, щелочей, металлов и оксидов металлов)

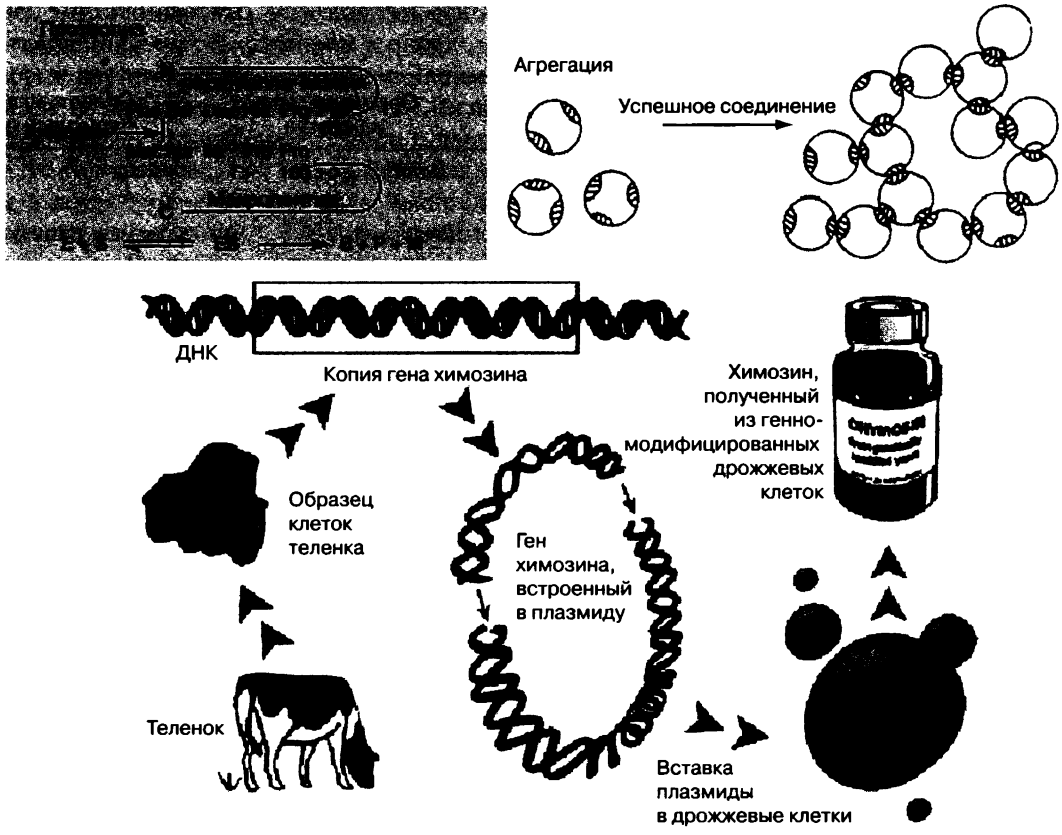


Рис. 18.10. Рекомбинантный химозин. Сверху показаны две стадии процесса свертывания молока химозином — протеолиз и агрегация, а снизу — процесс продуцирования химозина генно-модифицированными микроорганизмами, идентичный вырабатыванию этого фермента в организме жвачных животных. Сначала из животных клеток выделяется последовательность ДНК, кодирующая белок химозин. Данная последовательность в составе плазмиды встраивается в геном дрожжей. Клетка дрожжей, несущая рекомбинантную ДНК, клонируется и образует культуру клеток с заданным свойством. Дрожжевые клетки культивируют в биореакторах, где они продуцируют химозин, идентичный химозину животного происхождения. Поскольку такой химозин состоит из одного белка (а не из смеси белков), то он чище, чем сычужный фермент животного происхождения. По [58]

ферменты по своему действию весьма специфичны. В некоторых случаях их действие ограничивается образованием отдельных связей в соединениях, с которыми они взаимодействуют. Например, большинство протеаз расщепляют некоторые виды белка, но иногда при этом в белковых молекулах разрушаются лишь определенные виды связей (в зависимости от воздействующего фермента). В промышленном производстве такое избирательное действие ферментов позволяет увеличить выход продукции и минимизировать образование нежелательных побочных продуктов.

Ферменты классифицируют по тем соединениям, на которые они воздействуют. К наиболее распространенным ферментам относятся протеазы, расщепляющие белок (протеин), целлюлазы, расщепляющие целлюлозу, липазы, расщепляющие жиры и жирные кислоты, и амилазы, расщепляющие крахмал на простые сахара. Примеры некоторых доступных рекомбинантных ферментов приведены в табл. 18.1 [62].

18.5.1. Генная инженерия ферментов

Многие работы в области генной инженерии белка основаны на изучении субтилизина, продуцируемого *Bacillus amyloliquefaciens*. Так, основной фермент в моющем средстве производства фирмы *Novo Nordisk* («алкалаза») — это генно-модифицированный субтилизин. При его разработке в задачу специалистов по генной инженерии входило повышение активности фермента в составе моющих средств путем увеличения его стойкости при повышенных температурах и значениях pH, а также стойкости к окислению. Боль-

Таблица 18.1
Примеры генно-модифицированных ферментов. По [60]

Основная ферментная активность	Продуцирующий микроорганизм	Организм-донор или орган	Область применения (неполный перечень)
α-Ацетолактатдекарбоксилаза	*Bacillus amyloliquefaciens или subtilis*	*Bacillus sp.*	Напитки
α-Амилаза	*B. amyloliquefaciens или subtilis*	*Bacillus sp.*	Крахмал, напитки
	Bacillus licheniformis	*Bacillus sp.*	Крахмал, овощи и фрукты, напитки, сахар, хлебобулочные изделия
Каталаза	*Aspergillus niger*	*Aspergillus sp.*	Молоко, яйца
Химозин	*Aspergillus niger var. awamori*	Желудок теленка	Сыр
	K. lactis	Желудок теленка	То же
Циклодекстрин Глюканотрансфераза	*Bacillus licheniformis*	*Thermoanaerobacter sp.*	Крахмал
β-Глюканаза	*B. amyloliquefaciens или subtilis*	*Bacillus sp.*	Крахмал, напитки
	Trichoderma reesei или longibrachiatum	*Trichoderma sp.*	Крахмал, диетическое питание
Глюкозоизомераза	*Streptomyces lividans*	*Actinoplanes sp.*	Крахмал
	Streptomyces rubiginosus	*Streptomyces sp.*	То же
Глюкооксидаза	*Aspergillus niger*	*Aspergillus sp.*	Яйца, напитки, хлебобулочные изделия, салаты
Гемицеллюлаза	*B. amyloliquefaciens или subtilis*	*Bacillus sp.*	Хлебобулочные изделия
Липаза	*Aspergillus oryzae*	*Candida sp.*	Жиры
		Rhizomucor sp.	То же
		Thermomyces sp.	Жиры, хлебобулочные изделия
Мальтогенная амилаза	*B. amyloliquefaciens или subtilis*	*Bacillus sp.*	Крахмал, напитки, хлебобулочные изделия
Протеаза	*Aspergillus oryzae*	*Rhizomucor sp.*	Сыр
	B. amyloliquefaciens или subtilis	*Bacillus sp.*	Мясо, рыба, крахмал, напитки, хлебобулочные изделия, салаты
	Bacillus licheniformis	*Bacillus sp.*	Мясо, рыба
Пуллуланаза	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus sp.*	Крахмал
	Klebsiella planticola	*Klebsiella sp.*	Крахмал, напитки, хлебобулочные изделия
Ксиланаза	*Aspergillus oryzae*	*Aspergillus sp. и Thermomyces sp..*	Крахмал
	Aspergillus niger var. awamori	*Aspergillus sp.*	Хлебобулочные изделия
	Aspergillus niger	*Aspergillus sp.*	Крахмал, напитки, хлебобулочные изделия
	B. amyloliquefaciens или subtilis	*Bacillus sp.*	Крахмал
	Bacillus licheniformis	*Bacillus sp.*	То же
	Trichoderma reesei или Longibrachiatum	*Trichoderma sp.*	Крахмал, напитки

шинство замен аминокислотных остатков, в частности, замещение глицинового остатка (*Gly*166), позволяет повысить специфичность фермента к определенным пептидным связям и одновременно понизить специфичность к другим пептидным связям. Таким образом, в некоторых случаях лучший результат дает более случайное воздействие. Общий термин, используемый для обозначения молекулярных методов, которые воспроизводят естественный отбор и дают необходимый результат, — это «направленная эволюция» (*directed evolution,* рис. 18.11) [88]. В рамках этих методов на уровне генотипа инициируют случайные мутации, а затем проводят отбор желаемых характеристик на уровне протеома. К подобным методам относятся химический мутагенез, ПЦР повышенной точности, постепенный отсекающий отбор, перестановка генов и т. п. Разработка методов направленной эволюции основана на том, что новые свойства белков зачастую возникают при неочевидных мутациях, то есть рациональные методы генной инженерии типа сайт-направленного мутагенеза в эволюции белков имеют ограниченное применение. Методами направленной эволюции на генетическом уровне улучшают такие свойства ферментов, как специфичность и стабильность при заданных значениях pH и в определенных диапазонах температур [61].

Для пищевой промышленности хорошим примером непредсказуемости результатов генной инженерии белка может служить трипсин, активный центр которого во многом сходен с активным центром субтилизина. Замещение отрицательно заряженных остатков аспарагиновой кислоты (*Asp189*) на дне его кармана *P*1, где происходит связывание с основными боковыми цепями лизина или аргинина положительно заряженным лизином, дает предсказуемый результат в виде прекращения активности относительного обычных субстратов. Тем не менее, неожиданным результатом стало то, что это замещение обусловило прекращение активности относительно тех субстратов, в которых соответствующие (*S*1) сайты разрываемой пептидной связи были представлены молекулами аспарагиновой или глутаминовой кислот.

Значительные усилия в области генной инженерии ферментов направлены на получение термофильных ферментов. Известно, что такие ферменты обычно лишь ненамного стабильнее аналогичных мезофильных веществ. Термостойкость достигается за счет добавления лишь нескольких водородных связей, внутренней солевой связи или дополнительных внутренних гидрофобных остатков, в результате чего получается более гидрофобный центр. Все эти изменения слишком малы, и методами генной инженерии их не добиться. Для получения более предсказуемого результата необходимо сохранить вторичную структуру фермента, а это, как правило, ограничивает изменения внешней поверхности молекулы фермента. Например, заменой внутренних остатков глицина или серина на аланин можно увеличить термостойкость фермента благодаря небольшому увеличению гидрофобности внутримолекулярной зоны. Следует признать,

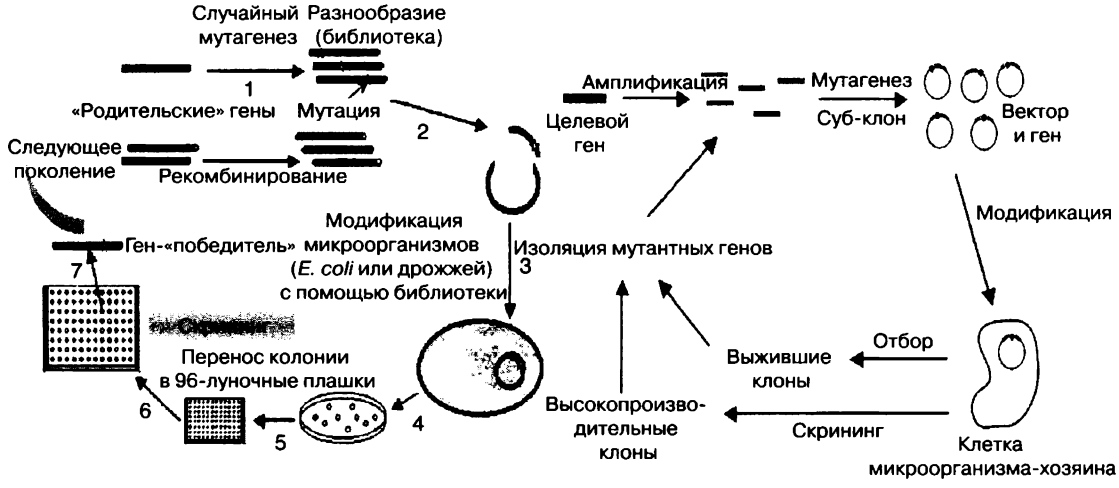


Рис. 18.11. «Направленная эволюция» в генной инженерии ферментов. Вызывают мутации и/или проводят рекомбинирование генов, отвечающих за продуцирование того или иного белка. В каждом следующем поколении отбирают «лучшие» гены для следующего этапа эволюции. Процесс повторяют столько раз, сколько требуется для получения оптимального фермента-биокатализатора с желаемыми свойствами: стабильностью при повышенных температурах или в органических растворителях, большей эффективностью, повышенной каталитической активностью и др. Рисунок публикуется с разрешения Майкла Тоуни (*Michael Toney*) из Калифорнийского университета, г. Дэвис, США

что при повышении термостойкости фермента снижается его гибкость (общая приспосабливаемость), из-за чего полученные синтетические ферменты могут обладать меньшей каталитической способностью.

18.5.2. Перспективы ферментных технологий

В последние годы благодаря достижениям генной инженерии произошла настоящая революция в биотехнологиях, повлиявшая и на производство ферментных препаратов. Так, методы генной инженерии позволили получать почти любые ферменты в больших количествах вне зависимости от источника. Методы генной инженерии белка позволяют подбирать свойства ферментов еще до их получения. Все это свидетельствует о том, что ферментные технологии находятся на очень важной стадии своего развития.

Традиционный способ получения ферментов зачастую требует больших затрат времени. Сначала пытаются получить фермент с требуемыми свойствами из почвенных и водных микроорганизмов. После выявления такого фермента продуцирующий микроорганизм культивируют и идентифицируют. Затем вызывают мутацию генома данного микроорганизма (химическими или радиологическими способами) в целях получения таких полезных свойств, как высокая скорость роста и размножения на простых средах, а также для удаления нежелательных побочных продуктов. После этого необходимо определить оптимальные условия для ферментации и провести токсикологические исследования, получив разрешение регламентирующих органов на промышленное применение полученных веществ.

Развитие генной инженерии и накопленные знания о штаммах трех типов микроорганизмов — бактерий рода *Bacillus,* грибов рода *Aspergillus* и дрожжей рода *Saccharomyces* — во многом изменили промышленное производство ферментов. Эти микроорганизмы хорошо изучены и безопасны в производстве, быстро растут и размножаются, а также дают большой выход ферментов, зачастую выделяя их в бродильную среду. Еще одним преимуществом является то, что среда для их выращивания и жизнедеятельности хорошо изучена, что позволяет избежать дорогостоящих экспериментов по оптимизации условий ферментирования. В настоящее время после выявления у нового микроорганизма полезного фермента ген, кодирующий этот фермент, можно быстро перенести в один из вышеперечисленных микроорганизмов. Достижения в области идентификации промоторов и использования кодонов позволяют получать большие количества высокочистых ферментов без побочной ферментативной активности. Это позволяет лучше контролировать катализируемые процессы и производить пищевые продукты более высокого качества.

В последнее время растет интерес к промышленному ферментативному синтезу органических химических веществ. Ферменты можно использовать для создания из простых молекул более сложных или для выборочного разделения смесей крупных молекул. Например, специфические гликозилтрансферазы (в частности, циклодекстрин-гликозилтрансферазу) можно использовать для получения циклодекстринов из простых молекул крахмала. Такие циклодекстрины служат хорошими носителями для некоторых чувствительных и нестабильных веществ типа витаминов или ароматизаторов. Химических методов создания этого класса веществ не существует, и в этом смысле ферментативный способ их получения уникален.

Существуют также возможности получения «искусственных» ферментов, представленных, как правило, синтетическими полимерами или олигомерами с ферментивно-подобной активностью. Эти вещества называют иногда «синзимами», то есть синтетическими энзимами или синтетическими ферментами, которые обладают характерными для ферментов свойствами. У них должно быть два структурных компонента: сайт связывания субстрата и каталитический сайт. Оказалось, что способность связывать субстрат обеспечивается довольно простым механизмом, однако каталитические сайты устроены сложнее. Сайты могут конструироваться независимо друг от друга, но если у «синзима» есть сайт связывания для переходных состояний, то выполняются сразу две этих функции. Некоторые синзимы — это белки, получить которые не сложно. Примером может служить дериватизация миоглобина, носителя кислорода в мышечной ткани, путем присоединения аминовых зондов рутения к трем поверхностным остаткам гистидина. Тем самым носитель кислорода превращается в оксидазу, окисляющую аскорбиновую кислоту (витамин С) и одновременно снижающую содержание молекулярного кислорода. Эффективность этого синзима практически аналогична натуральным аскорбатоксидазам. Гарантировать успешность создания белковых синзимов «с нуля» невозможно, поскольку в настоящее время нельзя предсказать их конформацию по первичной структуре. После появления таких белковых синзимов можно будет преодолеть очевидные недостатки природных ферментов, в частности, их подверженность денатурации, окислению и гидролизу.

Наряду с другими сферами применения биотехнологий новые инструменты для исследований в области промышленного производства и использования ферментов предоставляет ускоренное развитие функциональной геномики (биоинформатики, перестановки доменов и др.).

18.6. Растениеводство

18.6.1. Растениеводство и садоводство. Производство пищевых продуктов и кормов для животных из растительного сырья

В сельском хозяйстве биотехнологии (в форме технологии рДНК) стали существенным дополнением традиционных методов растениеводства и животноводства. Традиционные программы селекции требуют больших затрат времени и труда и сводятся к передаче генов между близкородственными видами. При этом селекционер не может осуществлять контроль на уровне генома, из-за чего проявляются и нежелательные характеристики растений (например, низкая урожайность или медленный рост). Технология рДНК позволяет манипулировать генами с точным и предсказуемым результатом. Отдельные признаки можно модифицировать значительно быстрее, чем при использовании традиционных методов селекции растений.

18.6.1.1. Трансформация растений

Основным инструментом биотехнологии в растениеводстве — от фундаментальных научных исследований до практического их применения — является трансформация генома растений (рис. 18.12).

Разработаны проверенные методы, позволяющие стабильно внедрять новые гены в геномы более 120 видов растений. При трансформации растений следует учитывать:

биологические и практические требования к трансформируемым системам;

необходимость создания оптимальных условий трансформации на всех этапах — при выборе эксплантов*, тканевой культуры, методов переноса генов, при селекции и выборе стратегий экспрессии трансгенов, что позволит обеспечить трансформацию даже самых эволюционно консервативных видов;

подтверждение трансформации генома.

Возможность внедрять и экспрессировать чужеродные гены в геном растений впервые была описана в 1984 г. на примере табака [42]. В настоящее время подтверждена возможность трансформации геномов более чем 140 видов растений, относящихся к 35 различным семействам, причем перенос гибридных генов осуществляется с помощью *Ti*-плазмидного вектора**. Значимые результаты достигнуты для многих важных сельскохозяйственных культур, овощей, декоративных, лекарственных, плодово-ягодных, древесных и пастбищных растений. Интенсивное развитие генной инженерии растений и информационных технологий приводит к быстрому устареванию имеющихся баз данных по трансформированным видам растений, что обусловливает необходимость проведения всякий раз дополнительного компьютерного поиска наиболее актуальных и точных данных по трансгенным растениям.

Непрерывное совершенствование методов трансформации генома растений направлено на повышение эффективности сельского хозяйства, расширение возможностей трансформации различных генотипов и обеспечение требуемых молекулярных характеристик трансформируемых растений. Вместе с тем проблемы переноса генов и воспроизводства трансгенных растений уже не являются сдерживающими факторами развития и практического применения методов генной иженерии. Основное внимание ученые уделяют получению оптимальных моделей экспрессии внедренных генов и преодолению экономических ограничений на широкое использование методов генной инженерии растений.

В настоящее время наиболее распространенным методом внедрения чужеродных генов в растительные клетки является трансформация растений с помощью патогенной для растений почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Эта бактерия естественным образом инфицирует поврежденные места двудоль-

* Эксплант — группа клеток, кусочек ткани или органа, культивируемый вне организма (*in vitro*). — *Примеч. ред.*

** *Ti*-плазмида — это плазмида почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, специфический Т-участок которой способен проникать в клетки двудольных растений и включаться в их ядерную ДНК, что ведет к образованию специфических опухолей – «галлов»; *Ti* — *Tumor-inducing*, то есть *опухлеобразующая*. — *Примеч. ред.*

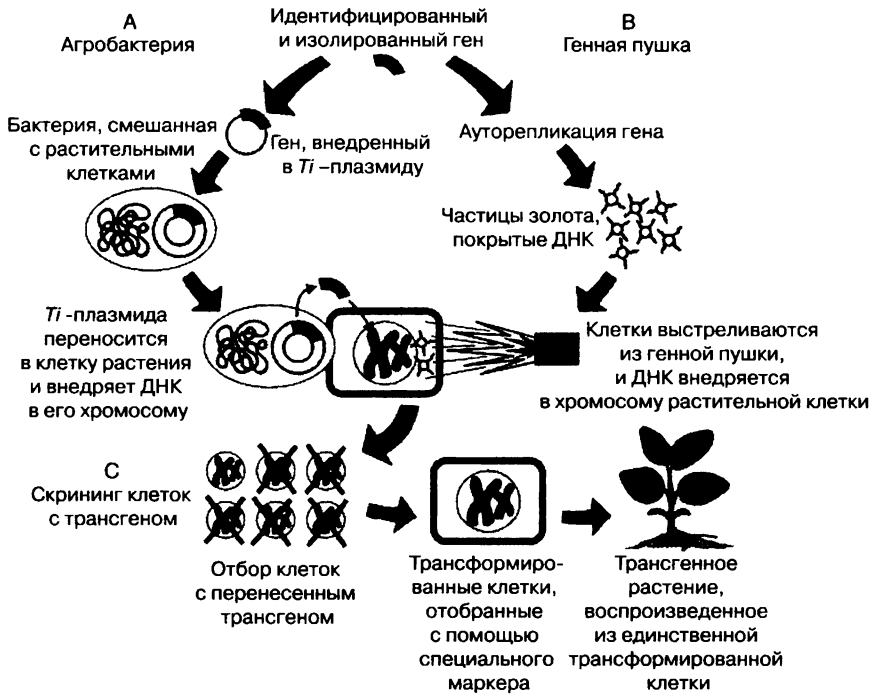


Рис. 18.12. Этапы трансформации растительных клеток. С разрешения Кента Брэдфорда (*Kent Bradford*) из Калифорнийского университета, г. Дэвис, США

ных растений, вызывая у них корончатый галл (*crown gall*, разрастание рыхлой ткани). Первые свидетельства того, что корончатый галл вызывает именно эта бактерия, были получены более 90 лет назад. Бактерия *A. tumefaciens* обладает исключительной способностью внедрять определенный участок ДНК (Т-ДНК) *Ti*-плазмиды в ядро инфицированной клетки, где она затем интегрируется в хозяйский геном и транскрибируется, вызывая развитие опухоли («корончатого галла»). В результате изучения процесса переноса Т-ДНК от *A. tumefaciens* в растительную клетку было выявлено три момента, которые и послужили основанием для практического применения этого метода в трансформации растений. Во-первых, процесс опухолеобразования — это процесс трансформации клеток растения путем переноса и интеграции Т-ДНК с последующей экспрессией генов Т-ДНК. Во-вторых, гены Т-ДНК транскрибируются только в клетках растений и в процессе переноса не играют никакой роли. В-третьих, в клетки растений могут быть перенесены любые участки ДНК, расположенные между границами Т-ДНК, независимо от того, чья это ДНК. Естественно, экспрессия перенесенного гена зависит от присутствия соответствующего промотора.

Со времен первой трансформации табака в начале 1980-х гг. в понимании механизмов опосредованного *A. tumefaciens* переноса гена в клетки растений был достигнут большой прогресс, однако эта бактерия естественным путем поражает только двудольные растения. Из-за отсутствия эффективных методов трансформации многие экономически важные однодольные сельскохозяйственные культуры, в том числе зерновые, оставались до начала 1990-х гг. вне досягаемости генетических манипуляций. Впоследствии для них также были разработаны методы прямой трансформации, в том числе метод микроинъекции на основе полиэтиленгликоля, метод протопластов, а также метод электропорации интактных клеток и технология биолистической пушки (см. ниже). Вместе с тем трансформация на основе *A. tumefaciens* обладает значительными преимуществами по сравнению с методами прямой трансформации. Она позволяет уменьшить число копий трансгена, что сокращает проблемы нестабильности и косупрессии трансгена. Кроме того, это «одноклеточная» трансформация, которая не приводит к мозаицизму* растений, иногда наблюдающемуся при использовании методов прямой трансформации.

* Мозаицизм (хромосомный или генетический) — это наличие в тканях многоклеточного организма клеток с разным генотипом. — *Примеч. ред.*

Ограниченность этого метода применительно к однодольным растениям удалось преодолеть в 1989 г., когда была разработана универсальная процедура внедрения ДНК в клетки. Эта технология, получившая название биолистической, состоит в использовании пушки, которая «выстреливает» в клетки частицы металлов, покрытые ДНК. Изначально использовавшийся для ускорения частиц твердый заряд этой пушки впоследствии был заменен гелием. Этим методом удалось обеспечить высокую успешность трансформации различных видов растений при минимальной дезинтеграции ткани [76].

У бактерии *Agrobacterium rhizogenes,* вызывающей у двудольных растений заболевание «волосатый корень», имеется крупная плазмида (так называемая *Ri*-плазмида, где *Ri — Root-inducing*). При инфицировании часть плазмиды (Т-ДНК) переносится из бактерии в клетки растения и затем встраивается в их ядерную ДНК по тому же механизму, что и *Ti*-плазмида. После проникновения Т-ДНК экспрессируется несколько генов, ответственных за это заболевание, после чего инфицированные клетки развиваются в придаточные корни. Растения с таким заболеванием быстро растут, их корни развиваются плагиотропно и обильно ветвятся в среде с отсутствием гормонов. Заболеванию, вызываемому *A. rhizogenes,* подвержены многие двудольные растения, и с помощью культуры «волосатого корня» были воспроизведены растения самых разных видов. Вместе с тем нередко у этих растений из-за экспрессии из Т-ДНК корневых локусов наблюдается измененный фенотип, что внешне проявляется в таких аномалиях, как подавление доминирования верхушки, снижение способности к размножению, уменьшение размеров междоузлий, сморщивание листьев, задержка цветения и плагиотропное развитие корней.

Бактерия *A. rhizogenes* осуществляет также перенос Т-ДНК с помощью бинарных векторов, что позволяет получать трансгенные растения с дополнительными генами, переносимыми второй плазмидой. Это используется для получения трансгенных растений, относящихся к разным видам. При независимых друг от друга локализациях *Ri* Т-ДНК и бинарного вектора Т-ДНК через несколько поколений их разъединение дает нормальные по фенотипу трансгенные растения, что было показано на примерах томатов, табака и рапса.

Применение «волосатых корней», то есть корней растений, полученных из растительных клеток, трансформированных бактерией *A. rhizogenes*, может стать основой производства биоактивных веществ. Такие трансформированные культуры уже получены для многих видов двудольных растений. Одной из главных задач научных исследований в данной области представляется использование технологии «волосатых корней» для биотрансформации химических веществ и увеличения образования вторичных метаболитов.

18.6.1.2. Агрономия трансгенных растений

У трансгенных сельскохозяйственных культур первого поколения изменения генома были направлены в основном на улучшение агрономических характеристик, однако в дальнейшем трансформация будет ориентирована на получение растений с оптимизированным химическим составом и повышенной добавленной стоимостью. На ранних стадиях развития агропромышленной биотехнологии основные преимущества от использования ГМ-культур получали фермеры, которые увеличивали урожайность, сокращали производственные затраты, использовали меньше инсектицидов и более эффективо боролись с насекомыми-вредителями и сорняками без негативного влияния на окружающую среду, а также защищали почву от эрозии и могли повысить рентабельность сельскохозяйственного производства [32]. Большинство потребителей не осознают выгод от использования биотехнологических культур первого поколения. Например, очень немногие осведомлены о 93%-ном снижении заражения кукурузы микотоксином фумонизином: благодаря внедрению ГМ-сортов кукурузы (*Bt),* стойких к поражению европейским сверлильщиком кукурузы, снизилось повреждение кукурузы насекомыми, и, следовательно, снизилась ее контаминация микроскопическими грибами, продуцирующими фумонизины [59]. Снижение содержания фумонизина напрямую связано со здоровьем человека и животных, поскольку этот микотоксин относится к наиболее токсичным и способен вызывать различные заболевания — от рака печени до поражений головного мозга. В табл. 18.2 приведены трансгенные культуры с улучшенными агрономическими свойствами, обусловливающими повышение качества пищевых продуктов и их функциональных свойств, а также облегчающих транспортировку, хранение и утилизацию. Мировым центром исследований и разработок в области биотехнологии растений остаются США и Канада, где ежегодно проводятся тысячи полевых испытаний новых ГМ-растений. В Канаде, например, было получено, одобрено и протестировано

Таблица 18.2

Сельскохозяйственные культуры для производства пищевых продуктов и кормов, соответствующих всем требованиям США по возделыванию и использованию. По данным сайта *http://usbiotechreg.nbii.gov/database_pub.asp (сайт регламентирующих ведомств США по биотехнолонии).*

Тривиальное название (в скобках — ботаническое)	Характерный признак	Заявитель(и) изобретения	Генетическое событие	Полученные признаки	Проверенные сведения о применении в США
Томат (*Lycopersicon esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*DNA Plant Technology Corporation*	1345-5	Замедленное созревание плодов; подавление эдогенной синтазы аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Канола (*Brassica napus, B. napus var. napus*)	Измененный жирнокислотный состав	*Calgene Inc.*	pCGN3828-212/86-18 pCGN3828-212/86-23	Высокое содержание лауриновых жиров; $C_{12:0}$ ацил-переносящий белок тиоэстераза; из *Umbellularia californica*	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Томат (*L. esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*Agritope Inc.*	35-1-N	Замедленное созревание плодов; S-аденозилметионин гидролаза; из бактериофага T3 *E. coli*	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Томат (*L. esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*Monsanto Company*	8338	Замедленное созревание плодов; дезаминаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACCD); из *Pseudomonas chloromphis*	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Томат (*L. esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*Zeneca & Petoseed*	B, Da (добавленная линия) F (добавленная линия) (всего 3 события)	Замедленное созревание плодов; фрагмент гена полигалактуроназы (*PG*); из томата	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Томат (*L. esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*Calgene Inc.*	Линия N73 1436-111	Замедленное созревание плодов; антисмысловая полигалактроназа (*PG*); из томата	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Томат (*L. esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*Calgene Inc.*	FLAVRSAVR (32 линии в 4 событиях), 532, 4109a, 5166 (добавленные линии) (всего 5 событий)	Замедленное созревание плодов; антисмысловая полигалактроназа (*PG*); из томата	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Канола (*B. napus, B. napus var. napus*)	Расщепление фитата	*BASF*	MPS961 MPS962 (добавленная линия) MPS963(добавленная линия) MPS964 (добавленная линия) MPS965 (добавленная линия) (всего 5 событий)	Расщепление фитата; фитаза; из *Aspergillus niger*	Пищевая промышленность и производство кормов

Дыня-канталупа (*Cumumis melo*)	Замедленное созревание плодов	*Agritope Inc.*	A B (добавленная линия) (всего 2 события)	Замедленное созревание плодов; S-адезилметионингидролаза; из *E. coli*	Пищевая промышленность и производство кормов
Соевые бобы (*Glycine max*)	Изменение жирнокислотного состава	*DuPont*	260-05	Высокое содержание олеиновой кислоты; ген *GmFad2*-1; из соевых бобов	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов
Томат (*L. esculentum*)	Замедленное созревание плодов	*Calgene Inc.*	CR3-613 CR3-623 (добавленная линия) (всего 2 события)	Замедленное созревание плодов; антисмысловая полигалактроназа (*PG*); из томата	Растениеводство, пищевая промышленность, производство кормов

Данные приведены по базе данных, причем лишь те, которые обеспечили повышение качества пищевых продуктов, их функциональных свойств, а также упрощение переработки и транспортировки. Сведения о применении приводятся в соответствии с базой данных, где по каждому продукту указаны лишь те области применения, для которых выполнены все соответствующие процедуры или рекомендации регламентирующих органов. Следует отметить, что не все продукты прошли процедуру получения разрешения на использование в той или иной области. Область «пищевая промышленность» означает, что данный продукт разрешен *FDA* и может использоваться для употребления человеком; если же данный продукт является растением, содержащим генетически встроенные средства защиты растений *(PIP, plant-incorporated protectant)*, то данное средство разрешено Управлением по охране окружающей среды (*EPA, Environmental Protection Agency*). Область «производство кормов» означает, что данный продукт разрешен *FDA* и может быть использован в качестве корма для животных. Область «растениеводство» означает, что культуры разрешены к возделыванию на территории США Службой по надзору за здоровьем животных и растений Министерства сельского хозяйства США (*USDA APHIS*)

в полевых условиях больше ГМ-культур, чем где бы то ни было в мире. На момент подготовки этой книги в США было разрешено возделывать 15 трансгенных культур, в том числе сою, кукурузу, хлопок, рапс, цикорий, лен, дыни, папайю, картофель, рис, тыкву, сахарную свеклу, табак и томаты.

Современная биотехнология помогает сельхозпроизводителям всего мира повысить урожайность и возделывать культуры с заботой об экологии при максимально эффективном использовании ресурсов, способствуя сокращению количества пахотных работ, снижению затрат на содержание теплиц, водоснабжение, оборудование и защиту почв (рис. 18.13) [44].

Одна из культивируемых ГМ-культур — это папайя, распространенная на Гавайских островах и в странах Юго-Восточной Азии (рис. 18.14). Ее возделывание во многих странах затруднено заболеванием, вызываемым стойким вирусом кольцевой пятнистости папайи (*PRSV, papaya ringspot virus-resistant)*, а также большими потерями при хранении. Появление папайи, устойчивой к этому вирусу (благодаря применению метода *RNAi*-подавления экспрессии вирусного белка), сохранило для экономики Гавайских островов $17 млн и оказалось крайне важным для Тайваня и других стран Юго-Восточной Азии. Данный вид устойчивости обусловлен проявлением пост-транскрипционного подавления экспрессии генов (*PTGS*). Помимо защиты обычных растений папайи благодаря отсутствию белков вируса кольцевой пятнистости ГМ-папайя может оказаться полезной и для производителей так называемой «органической» продукции. Имеется ряд данных, что у вирусных белков имеются последовательности, аналогичные встречающимся у одного известного аллергена, то есть ГМ-папайя может приобретать аллергенные свойства, однако на Гавайских островах, на «родине» этого вируса, с 1940-х гг. не было официально зарегистрировано ни одного случая аллергической реакции, вызванной этим вирусом. На основании клинических испытаний было показано, что даже если ген, обусловливающий устойчивость к *PRSV,* имеет модифицированные кодоны и аминокислотная последовательность белков вируса кольцевой пятнистости может несколько отличаться от природной, то никаких аллергических реакций он не вызовет, поскольку при переваривании в желудочно-кишечном тракте первичная структура белка не имеет значения, тогда как при ингаляционном поступлении аллергенные свойства напрямую зависят от конформации белковой молекулы.

Такая система применяется в настоящее время и для других видов растений. Так, дали свои плоды пятилетние усилия по борьбе с вирусным заболеванием сливы («скрытой мозаикой») методом *PTGS.* В 1990 г. специалисты Службы сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США (*ARS, Agricultural Research Service*) начали работать над геном вирусного белка папайи, предоставленного Деннисом Гонсалвешем (*Dennis Gonsalves*). Этот ген на 70% оказался гомологичен гену скрытой мозаики

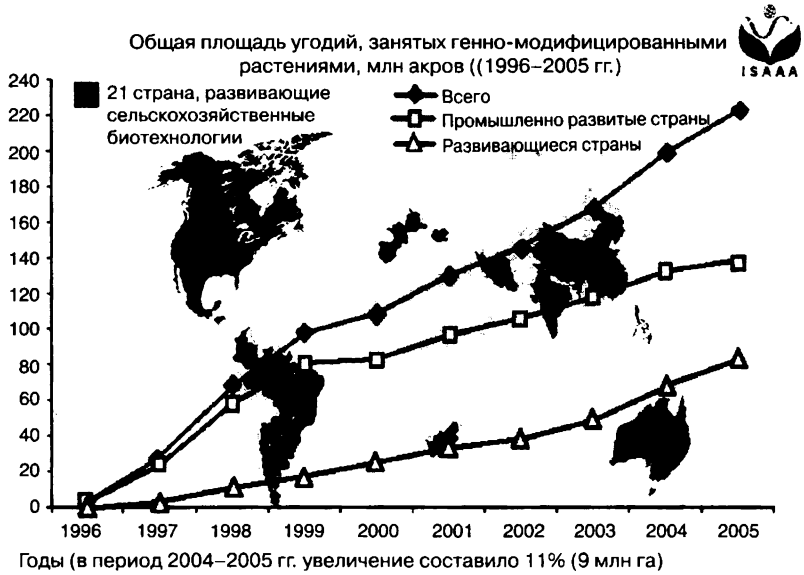


Рис. 18.13. Распространение производства генно-модифицированного растительного сырья. По [43]

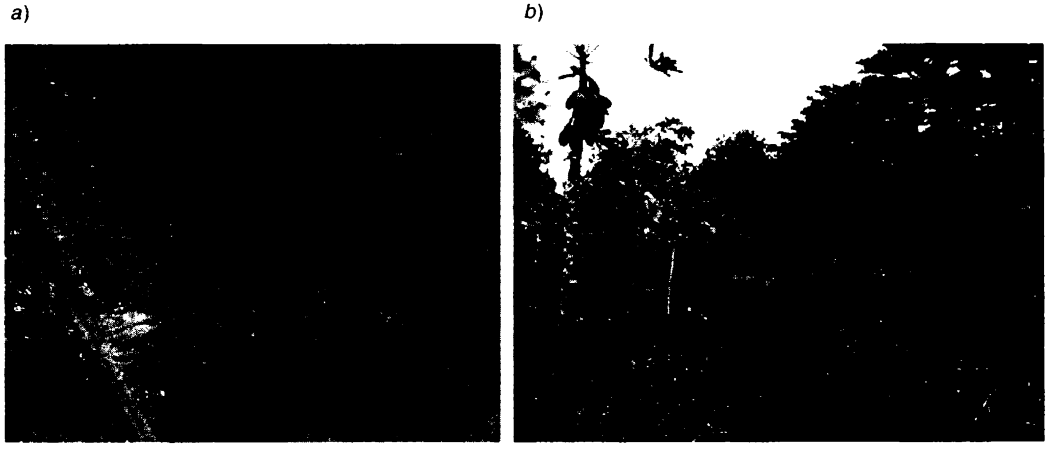


Рис. 18.14. Опытные участки с трансгенной папайей сортов «*UH Rainbow*» и «*UH SunUp*» (*UH* — Гавайский университет), заложенные в октябре 1995 г. в г. Пуна, Индия: *a* — аэроснимок трансгенных опытных посадок. Плотный «блок» зеленых деревьев папайи в центре — это трансгенные растения, а окружающие их нетрансгенные растения, имеющие нездоровый вид, серьезно поражены вирусом *PRSV*; *b* — Признаки поражения вирусом *PRSV* хорошо различимы на нетрансгенных растениях (с левой стороны дорожки). Справа стоят устойчивые к этому вирусу трансгенные растения сорта «*UH Rainbow*». Фото предоставлено Стивом Феррара (*Steve Ferrara*) из Гавайского университета

(«оспы») сливы; он используется и для контроля других вирусов, сходных с вирусом кольцевой пятнистости у папайи. Было показано, что в случаях, когда восприимчивость или устойчивость к заболеванию обусловлена одним геном, то такую устойчивость легко контролировать с помощью альтернативных механизмов воздействия, позволяющих снять барьеры на пути развития устойчивости к вирусу. К другим используемым методам относятся экспрессия ферментов вируса с реплицирующимися РНК, экспрессия сателлитной РНК, репликация молекул РНК, которые являются молекулярными паразитами вируса, а также использование ингибиторов протеазы, препятствующих образованию вирусных белков.

Еще одним значительным шагом в развитии сельскохозяйственной биотехнологии является создание растений с улучшенными потребительскими свойствами и оптимизированным составом, что открывает новые перспективы в производстве пищевых продуктов и кормов для животных. Вместе с тем многие проблемы, проявившиеся с самого начала использования ГМ-культур 1-го поколения, не решены и по сей день (например, «буксующая» система регулирования применения ГМО в странах ЕС), поэтому они будут оказывать влияние и на использование ГМО 2-го поколения с улучшенными потребительскими свойствами.

18.6.1.3. Переработка пищевых продуктов и их функциональные свойства. Вопросы безопасности для здоровья и пищевой ценности

Функциональные пищевые продукты можно определить как модифицированные пищевые продукты или их компоненты, обеспечивающие дополнительное положительное влияние на здоровье (помимо обеспечиваемого традиционными пищевыми продуктами). Понятие «нутрицевтический» относится к любому веществу, которое «является пищевым продуктом или его частью и обеспечивает положительное влияние на организм человека, включая профилактическое или терапетическое действие» [15].

С точки зрения перспектив использования в производстве функциональных пищевых продуктов растительные компоненты делят на четыре основные категории:

макронутриенты (белки, углеводы, жиры и пищевые волокна);

микронутриенты (витамины, минеральные вещества, фитохимические соединения);

«антинутриенты» (вещества типа фитатов, ограничивающие биодоступность нутриентов);

- аллергены и токсины.

Фитохимические соединения* и функциональные пищевые продукты (иногда их называют нутрицевтиками) вызывают все больший интерес с точки зрения профилактики и/или лечения четырех групп заболеваний, являющихся основными причинами смертности в США, а именно онкологических, диабета, сердечно-сосудистых и гипертензии. По оценкам Национального института рака США (*U.S. National Cancer Institute*) каждый третий случай смерти от онкологических заболеваний связан с неправильным питанием, а восемь из десяти случаев онкологии обусловлены рационом или режимом питания [6, 84]. Выявлена также связь между потреблением жиров и пищевых волокон и риском возникновения рака толстой кишки, между потреблением фолатов и возникновением дефекта нервной трубки плода, между потреблением кальция и остеопорозом, между потреблением псиллиума (из семян подорожника) и снижением содержания липидов в крови, между антиоксидантами и связыванием активных окислителей (благодаря чему клетки защищаются от окислительных повреждений, ведущих к хроническим заболеваниям). Мы перечислили лишь небольшую часть таких веществ [34] — примеры других фитохимических соединений приведены в табл. 18.3 [15].

Таблица 18.3
Некоторые компоненты растительного сырья с полезными для здоровья свойствами. По [14]

Соединения и их классы	Растительный источник	Потенциальная польза для здоровья
Каротиноиды:		
α-каротин	Морковь	Нейтрализация повреждающих клетки свободных радикалов
β-каротин	Различные овощи и фрукты	Нейтрализация свободных радикалов
Лютеин	Зеленые овощи	Поддержание хорошего зрения
Ликопин	Томаты и томатные продукты (кетчуп, соусы)	Снижение риска рака простаты
Зеаксантин	Яйца, цитрусовые, кукуруза	Поддержание хорошего зрения
Пищевые волокна		
Нерастворимые пищевые волокна	Пшеничные отруби	Снижение риска мастопатии и/или рака прямой кишки
β-глюкан	Овес	Снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний
Растворимые пищевые волокна	Псиллиум (семена подорожника)	То же
Цельное зерно	Зерна злаковых культур	— ''—
Гидролизат коллагена	Желатин	Облегчение симптомов остеоартрита
Жирные кислоты		
Омега-3 жирные кислоты (ДГК и ЭПК)	Тунец; другие виды рыб и рыбий жир	Снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний, стимулирование мозговой деятельности, улучшение зрения
Конъюгированная линолевая кислота (КЛК)	Сыр, мясные продукты	Улучшение состава тканей тела, снижение риска некоторых видов рака
Флавоноиды		
Антоцианидины: цианидин	Ягоды	Повышение активности ксенобиотических защитных ферментов, снижение риска онкологических заболеваний
Гидроксициннаматы	Пшеница	Действие, подобное антиоксидантам, снижение риска дегенеративных (возрастных) заболеваний
Флаванолы: катехины, таннины	Чай (зеленый) — катехины; чай (черный) — таннины	Нейтрализация свободных радикалов, снижение риска онкологических заболеваний

* Фитохимические соединения — это в основном вторичные метаболиты растений. В зависимости от вида растения их насчитывается от 80 до 100 тыс. — *Примеч. авт.*

Таблица 18.3 (окончание)

Соединения и их классы	Растительный источник	Потенциальная польза для здоровья
Флаваноны	Цитрусовые	Нейтрализация свободных радикалов, снижение риска онкологических заболеваний
Флавоны: кверцетин	Овощи и фрукты	То же
Глюкозинолаты, индолы, изотиоцианаты		
Сульфорафан	Овощи семейства капустных (капуста-брокколи, кормовая капуста, редька, редиска)	Повышение активности ксенобиотических защитных ферментов, снижение риска онкологических заболеваний
Фенолы		
Стильбены: ресвератрол	Виноград	Снижение риска дегенеративных (возрастных), сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний
Кофеиновая и феруловая кислоты	Фрукты, в том числе цитрусовые, и овощи	Действие, подобное антиоксидантам, снижение риска дегенеративных (возрастных), сердечно-сосудистых и офтальмологических заболеваний
Растительные станолы и стеролы		
Эфир станола и стерола	Кукуруза, соя, пшеница; тунговое масло (древесное масло, масло кукуи)	Снижение риска ишемической болезни сердца благодаря снижению уровня холестерина в крови
Пре- и пробиотики		
Фруктаны, инулин, фруктоолигосахариды (ФОС)	Иерусалимский артишок, лук-шалот, луковый порошок	Улучшение состояние желудочно-кишечного тракта
Лактобактерии	Йогурт и другие кисломолочные продукты	То же
Сапонины	Соевые бобы, соевые продукты, продукты с соевым белком	Снижение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), продуцирование противораковых ферментов
Соевый белок	Соевые бобы и продукты на основе сои	Снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний (при потреблении 25 г/сут.)
Фитоэстрогены		
Изофлавоны: дайдзеин, генистеин	Соевые бобы и продукты на основе сои	Ослабление симптомов менопаузы, в том числе приливов, снижение риска остеопороза и сердечно-сосудистых заболеваний
Лигнаны	Лен, рожь, овощи	Снижение риска сердечно-сосудистых и некоторых видов онкологических заболеваний, снижение общего уровня холестерина и холестерина в ЛПНП, а также содержания триглицеридов
Сульфиды/тиолы		
Диаллилсульфид	Лук (репчатый, зеленый и лук-порей), чеснок, оливки	Снижение уровня холестерина в ЛПНП, поддержание здоровья иммунной системы
Аллилметилтрисульфид, дитиолтионы	Овощи семейства капустных	То же
Таннины		
Проантоцианидины	Клюква и продукты на ее основе, какао, шоколад, черный чай	Улучшение состояния мочевыводящей системы; Снижает риск сердечнососудистых заболеваний и гипертензии

Для одной из групп фитохимических соединений, содержащихся в овощах (например, в капусте-брокколи), а именно изотиоцианатов (и родственных им глюкозинолатов, индолов и сульфорафанов) подтверждена их способность регулировать действие ферментных систем, блокирующих или подавляющих повреждение клеточных ДНК, а также уменьшать размер опухолей [31].

Существование огромного числа фитохимических соединений, их влияние на здоровье человека и животных, а также растущий интерес к функциональным пищевым продуктам способствуют прогрессу в развитии данного направления биотехнологии растений, делая его весьма привлекательным для исследователей.

18.6.1.4. Метаболическая инженерия

Проблема выведения растений с улучшенными потребительскими свойствами связана с преодолением трудностей технического характера, для преодоления которых могут быть использованы методы метаболической инженерии. Для получения растений с требуемыми качественными признаками метаболические инженеры используют как традиционную селекцию, так и генную инженерию. Понятие «метаболическая инженерия» обычно относят к искусственному изменению одной или нескольких ферментативных реакций в целях оптимизации продуцирования клеткой уже существующих соединений или продуцирования новых, а также деградации соединений, нежелательных для данного продукта. В последние годы был достигнут значительный прогресс в молекулярном анализе метаболических путей и использовании технологии клонирования генов для метаболической инженерии растений. Некоторые примеры улучшения нутритивных свойств растений на макро- (белки, углеводы, жиры, пищевые волокна) и микроуровне (витамины, минеральные и фитохимические вещества), а также нейтрализации антинутриентов методами метаболической инженерии, приведены в разделах 18.6.2–18.6.3.

Несмотря на очевидные успехи метаболической инженерии, большая часть исследований в этой области дает неожиданные и противоречивые результаты. Так, изменение свойств растений посредством добавления одного-двух целевых генов обеспечивает требуемый эффект, однако метаболические манипуляции не всегда приводят к получению требуемых признаков, что можно объяснить нехваткой знаний из области метаболизма растений. Несмотря на успехи в области клонирования, анализа и манипулирования отдельными генами и белками, сведения об их участии в метаболических путях превращения веществ в организме растений носят неполный и неуточненный характер. Полученные результаты свидетельствуют, что знания об отдельных кинетических свойствах ферментов не объясняют их общей роли. Более того, очевидно, что при экстраполяции функции какого-либо фермента в рамках сложного метаболического пути очень велика погрешность. Таким образом, система оценки безопасности ГМ-продуктов, поступающих на продовольственный рынок, должна включать исследования, направленные на выявление «незаданных» эффектов модификации, причем появление новых модификаций метаболических путей обязательно должно сопровождаться выработкой новых подходов к оценке безопасности продуктов для здоровья и новых методов анализа.

18.6.2. Макронутриенты

18.6.2.1. Белок

Для многих растений характерен недостаточный с точки зрения потребностей организма животных и человека баланс эссенциальных (незаменимых) аминокислот. Так, в зерновых культурах (кукурузе, пшенице, рисе и др.) мало лизина, а в бобовых (сое, горохе) зачастую недостаточно серосодержащих аминокислот (метионина и цистеина). Хорошим примером улучшения аминокислотного баланса в настоящее время могут служить кукуруза, канола (разновидность рапса) и соевые бобы с повышенным содержанием лизина [23, 65]. Потребление пищевых продуктов, изготовленных на основе этих культур, может решить проблему несбалансированности рациона населения развивающихся стран, особенно детского питания.

У птиц, свиней и других нежвачных животных существует своя потребность в аминокислотах. Основными требованиями к кормам на основе кукурузы и соевых белков является присутствие лизина (в кормах для млекопитающих) и метионина (в корме для птицы). Кукуруза с высоким содержанием лизина и соя с высоким содержанием метионина способны обеспечить составление рациона со сбалансированным составом аминокислот, что поможет снизить количество выделяемого животными азота (при несбаланси-

рованном аминокислотном составе кормов организм животных выделяет повышенное количество азота). В настоящее время такую сбалансированность состава аминокислот достигают путем внесения в корма дорогостоящих добавок — синтетических лизина и метионина.

Одним из способов модификации состава резервных белков является внедрение гетеро- или гомологичных генов, кодирующих белки с повышенным содержанием серосодержащих аминокислот (метионина и цистеина) и лизина. Так, был разработан синтетический белок *MB*1 (с молекулярной массой 11 кДа), содержащий максимальное количество эссенциальных аминокислот (метионина, треонина, лизина и лейцина) в стабильной спиральной конформации, и со структурой, стойкой к действию протеаз, благодаря чему не происходит расщепления белка в растениях (*in planta*) [5]. Аминокислотный состав белка *MB*1 (16% метионина и 12% лизина) делает его прекрасным кандидатом на улучшение качества соевых белков. В векторах трансформации этот белок должен служить для засева телец с запасным белком с помощью соответствующих лидерных последовательностей и специфичных для засева промоторов [79].

Для модификации картофеля использовался ген альбумина из белка амаранта (*Amaranthus*), который в отличие от альбумина бразильского ореха не вызывает аллергии и богат всеми эссенциальными аминокислотами [13]. В результате в трансгенной популяции было достигнуто значительное ускорение роста и повышение урожайности корнеплодов по сравнению с контрольной выборкой; кроме того повысилось содержание белка и большинства эссенциальных аминокислот [13]. Результаты этой работы свидетельствуют не только о достижениях в улучшении качества картофеля, но и о возможности генетической модификации других незерновых культур с иным белковым составом, например, батата (сладкого картофеля) геном синтетического запасного белка *ASP*-1 [70]. Общее содержание белка в корнях и листьях этих трансгенных растений по сравнению с контрольной группой увеличилось соответственно от двух до пяти раз. Одновременно наблюдалось и значительное повышение содержания эссенциальных аминокислот — метионина, треонина, триптофана, изолейцина и лизина [70]. При этом следует учитывать, что при любых попытках улучшить аминокислотный баланс содержание и состав запасных белков не должны ухудшать нормальное развитие растения [72].

При создании заданного метаболического фенотипа растений необходимо учитывать их катаболические и анаболические характеристики, о чем свидетельствуют попытки изменить содержание лизина в семенах. Основным катализатором синтеза лизина служит дигидродипиколинатсинтаза, ингибируемая по обратной связи метаболизма конечного продукта (лизина) и играющая тем самым ключевую роль в данном пути метаболизма. При создании растений, которые сверхэкспрессируют нечувствительную бактериальную дигидродипиколинатсинтазу, роль данного пути метаболизма лизина существенно возрастает, но в большинстве случаев это не приводит к повышению содержания стабильного лизина, поскольку растения реагируют на это путем увеличения метаболизма по катаболическому пути расщепления лизина благодаря увеличению содержания лизинкетоглютаратредуктазы. Значительное повышение содержания лизина наблюдается у растений лишь тогда, когда поток веществ усиливается настолько, что первый фермент катаболического пути становится насыщенным [8].

18.6.2.2. Углеводы

Растения продуцируют как полисахариды (крахмалы и фруктаны), так и отдельные сахара (сахарозу и фруктозу). Биосинтез этих соединений достаточно изучен, что позволяет конструировать нужные характеристики методами биоинженерии и создавать культуры, продуцирующие полисахариды, отсутствующие в обычных растениях.

Для генной инженерии сельскохозяйственный культур можно использовать гены, ответственные за синтез фруктанов. Фруктаны являются очень важными компонентами функциональных пищевых продуктов. Имеются свидетельства, что в качестве пребиотика они способствуют поддержанию функциональности толстой кишки и снижают риск рака толстой кишки. Наибольший интерес с точки зрения продуцирования фруктана представляет сахарная свекла, поскольку ее главным резервным углеводом является сахароза — предшественник биосинтеза фруктана. В работе [78] показано, что накопление фруктана в трансгенной сахарной свекле происходит без негативного влияния на развитие растения и его фенотип. Полученные результаты могут быть использованы как в промышленном производстве фруктанов, так и в генной инженерии (для получения новых продуктов из уже существующих культур). Аналогичный

подход был использован для получения соевых бобов с олигофруктанами, которые селективно увеличивают популяцию полезных бактерий (в том числе бифидобактерий) в кишечном тракте человека и некоторых животных, а также ингибируют рост и размножение патогенных бактерий (в том числе *E. coli* O157:H7, сальмонелл и т. д.) [15]. Тем самым соевые бобы с повышенным содержанием олигофруктанов способны заменить некоторые антибиотики, используемые в настоящее время для лечения заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами. При ферментации бактериями толстого кишечника пищевых волокон или иных неусваиваемых углеводов образуются низкомолекулярные насыщенные жирные кислоты, которые облегчают всасывание минеральных веществ (железа, кальция и цинка) [90].

Растворимые олигосахариды (стахиоза и раффиноза) вызывают у человека вздутие живота и проблемы с пищеварением [39, 85]. Раффиноза и стахиоза из обычных соевых бобов или комбикормов на основе сои не усваиваются нежвачными животными, что снижает пищевую ценность таких кормов. Было показано, что корма на основе сои с низким содержанием стахиозы, которые дают свиньям в подсосный период в качестве предстартера, положительно сказываются на скорости роста животных [75]. Кроме того, повышенное содержание сахарозы в соевых продуктах с низким содержанием стахиозы придает этим продуктам более сладкий вкус. Модификация данного семейства олигосахаридов по технологии рДНК проводится путем ингибирования активности галактинолсинтазы [51]. Это первый этап биосинтеза стахиозы и получения галактинола из УДФ-галкатинола и миоинозитола. Затем конкретными галактозилтрансферазами (например, раффинозо- и стахиозосинтазой) синтезируются отдельные соединения. Поскольку раффиноза и стахиоза играют ключевую роль в развитии семян и при их хранении, может оказаться целесообразной альтернативная методика, основанная на переносе в бобовые культуры α-галактозидазы из термофильной бактерии *Thermotoga neapolitana*, вызывающей разложение олигосахаридов после сбора урожая путем термического потенцирования α-галактозидазы [36].

Представляют определенный интерес и достижения в области генетической модификации картофельного крахмала. УДФ-глюкоза-пирофосфорилаза (УДФГПФ) растительного происхождения чувствительна к действию аллостерических эффекторов, и ее можно использовать в качестве основного регулятора, ограничивающего биосинтез крахмала. Была получена аллостерически нечувствительная УДФГПФ *E. coli* дикого и мутантного типа, предназначенная для экспрессии хлоропластов при формировании клубня картофеля [83]. Содержание крахмала в клубнеплодах растений, трансформированных с помощью аллостерически нечувствительного фермента УДФГПФ *E. coli*, оказалось на 40% выше, чем в клубнеплодах дикого типа. Такое высокое содержание крахмала означает, что при жарке картофель будет впитывать меньше жира, замещающего теряемую при жарке влагу. Проблема неравномерного распределения гранул крахмала в клубнеплодах до сих пор не решена.

На физико-химические свойства крахмала существенно влияет соотношение амилозы и амилопектина, и зачастую желательно иметь дело с чистой или обогащенной фракцией амилопектина или амилозы. В работе [77] описано создание картофеля с очень высоким содержанием высокоамилозного крахмала (медленно усваиваемого), который был получен путем ингибирования двух ферментов, дающих в обычных растениях быстро усваиваемый организмом амилопектиновый крахмал. Этот «устойчивый крахмал» в тонком кишечнике не усваивается, а ферментируется микробиотой толстой кишки. Клинические исследования показали, что такой крахмал обладает свойствами, аналогичными пищевым волокнам, и может положительно влиять на здоровье человека [15, 74].

18.6.2.3. Пищевые волокна

Пищевые волокна или клетчатка — это группа веществ, по химическому составу сходных с углеводами, но нежвачные животные плохо их метаболизируют. Пищевые волокна присутствуют лишь в пищевых продуктах растительного происхождения, а в продуктах животного происхождения их нет. Пищевые волокна придают объем, так что продукты с высоким их содержанием обеспечивают ощущение сытости, но не дают калорий. За исключением некоторых дискуссионных вопросов в настоящее время очевидно, что богатые пищевыми волокнами пищевые продукты положительно влияют на здоровье человека — так, они снижают риск рака толстой кишки и других онкологических заболеваний.

Тип пищевых волокон и их количество контролируется генетически, хотя этот вопрос изучен еще недостаточно. Технологии и методы генной инженерии, которые позволят изменять содержание пищевых

волокон и их типы, окажут положительное влияние на состояние здоровья многих людей, которые по вкусовым или иным соображениям потребляют недостаточно пищевых волокон. Пищевые волокна можно будет добавлять в предпочтитаемые человеком пищевые продукты или видоизменять наиболее распространенные их источники так, чтобы усилить их положительное влияние на здоровье человека.

Лигнаны — это вещества, родственные пищевым волокнам. Для млекопитающих важны два основных лигнана — энтеродиол и энтеролактон (продукт окисления энтеродиола), которые образуются в кишечном тракте под действием бактерий на вещества-предшественники лигнанов. Богатейшим источником таких веществ-предшественников лигнана для млекопитающих являются семена льна. Энтеродиол и энтеролактон по своей структуре близки как к природным, так и синтетическим эстрогенам. Они обладают незначительной эстрогенной и антиэстрогенной активностью, благодаря чему могут играть определенную роль в предотвращении обусловленных эстрогеном онкологических заболеваний [73]. В настоящее время уже клонированы гены, кодирующие ферменты для преобразования кониферилового спирта (предшественника лигнана и лигнина) в секоизоларицирезинол (основной пищевой фитоэстроген).

Как будет видно из раздела 18.6.3.3, посвященного антинутриентам, в настоящее время предпочтение зачастую отдается кормам для животных с низким содержанием пищевых волокон. В организме нежвачных животных продуцируется недостаточно ферментов, необходимых для усвоения целлюлозосодержащих пищевых волокон. Растения с небольшим содержанием пищевых волокон, скармливаемые животным с простым однокамерным желудком, дают более усваиваемые белки и легче метаболизируемую энергию, благодаря чему образуется меньше навоза и метана [63]. Улучшение усвоения пищевых волокон жвачными животными будет иметь сходный положительный эффект, поскольку эффективность усвоения жвачными животными кормов с максимальным содержанием клетчатки в настоящее время далека от оптимальной.

18.6.2.4. Жиры

Для получения новых эффективных средств модификации семян масличных растений, повышения их нутритивной ценности и обеспечения требуемых технологических свойств для различных видов применения растительных жиров и масел, были объединены усилия специалистов по генной инженерии и растениеводству. В настоящее время разрабатываются генно-модифицированные растения, которые можно будет использовать для получения тех промышленных жиров и масел, которые в настоящее время получают из продуктов нефтепереработки.

Генетические модификации масличных культур позволят получить богатый источник сравнительно недорогих пищевых жирных кислот, оказывающих позитивное воздействие на организм человека. Производство таких липидов в виде растительных масел — весьма удобный способ обеспечить население здоровым пищевым продуктом, не требующим значительных изменений в рационе. Основные изменения в жирнокислотном составе некоторых масличных культур были достигнуты традиционными методами селекции, методами индуцированной мутации, а также методом пос-транскрипционного подавления экспрессии генов (*PTGS*). В качестве примеров можно привести соевое и рапсовое масло (масло канолы) с низким и вообще нулевым содержанием насыщенных жиров, масло канолы, содержащее жирные кислоты со средней длиной цепи (ЖКСДЦ), масло канолы с высоким содержанием стеариновый кислоты (для продуктов, не содержащих *транс*-изомеры жирных кислот), соевое масло с высоким содержанием олеиновой кислоты (мононенасыщенной), а также масло канолы, содержащее полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), λ-линоленовую кислоту (ГЛК, $C_{18:3}$ ω-6), стеаридоновую кислоту (*SDA*, $C_{18:4}$ ω 3) и другие ω-3 жирные кислоты [92]. Эти генно-модифицированные жиры и масла уже производятся в промышленном масшабе, и во многих странах действуют нормативные акты относительно обеспечения безопасности инновационных пищевых продуктов, производимых по традиционной технолоргии.

Жирные кислоты со средней длиной цепи (с 6–9 атомами углерода) относятся к минорным компонентам натуральных пищевых продуктов (за исключением кокосового и пальмоядрового масел). Так, в составе сливочного масла ЖКСДЦ составляют менее 5%, а в кукурузном масле их вообще нет. Триглицериды со средней длиной цепи (ТГСДЦ) метаболизируются иначе, чем высокомолекулярные триглицериды, поскольку они минуют лимфатическую систему, быстро окисляются и являются источником «быстрой» энергии. Кроме того, они способствуют усвоению кальция и магния [28]. При замене ТГСДЦ в рационе

животных низкомолекулярными триглицеридами животные хуже набирают вес, у них образуется меньше жировой ткани и ускоряется обмен веществ [2, 30]. Мыши, которым давали корм с ТГСДЦ, в тесте на принудительное плавание оказались более выносливыми, чем мыши, получавшие корм с низкомолекулярными жирными кислотами [28]. Судя по всему, именно такие факты привели к тому, что масла с ТГСДЦ появились на рынке «эргогенических» и пищевых добавок, повышающих выносливость и работоспособность. Поскольку ЖКСДЦ в обычных пищевых продуктах в больших количествах не присутствуют, их вводят в рацион в виде особых добавок, что сделало их предметом пристального внимания ученых. В работе [17] для получения ферментов, участвующих в синтезе содержащих ТГСДЦ каприновой и каприловой кислот, использовались гриб *Morilena* и растения. Экспрессия кДНК ацил-АЦП-тиоэстеразы из растения куфея (*Cuphea hookeriana*) в семена трансгенной канолы, которая в обычном состоянии не накапливает ни каприновой, ни каприловой кислот, дала существенное увеличение содержания этих двух ЖКСДЦ [17].

Пищевые масла с высоким содержанием мононенасыщенных жирных кислот обеспечивают повышение стабильности масла, вкуса и пищевой ценности рациона человека и животных. Мононенасыщенная олеиновая кислота ($C_{18:1}$) более стабильна, чем полиненасыщенные линолевая ($C_{18:2}$) и линоленовая ($C_{18:3}$) кислоты. Кроме того, мононенасыщенные кислоты более полезны для здоровья. Антисмысловое ингибирование экспрессии олеатдесатуразы в соевых бобах позволяет получить масло, содержащее более 80% олеиновой кислоты (в обычном масле ее 23%) и значительно меньше полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) [53]. Высокоолеиновое соевое масло обладает естественной стойкостью к окислению и термостойкостью, благодаря чему в зависимости от сферы применения конкретного растительного масла оно практически не требует гидрогенизации после очистки. Лауриновая кислота ($C_{12:0}$) известна своими противомикробными свойствами, а ее моноацилглицериновое производное (монолаурин) обладает еще более сильными антимикробными и антивирусными свойствами относительно РНК- и ДНК-вирусов с липидной оболочкой, многочисленных патогенных грамположительных бактерий и некоторых патогенных простейших. Первым промышленно выпущенным генно-модифицированным пищевым маслом стало высоколауриновое масло канолы. Были клонированы гены калифорнийского лавра, кодирующие лауроил-АЦП-тиоэстеразу, которые перенесены в каноlу (рапс с низким содержанием эруковой кислоты). Полученное масло (*Laurical*) было разрешено *FDA* США к использованию в составе пищевых продуктов [19].

Разработка масел с иным соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот была обусловлена многочисленными факторами, свидетельствующим об их пользе для здоровья человека и улучшении качества пищевых продуктов. Например, твердые триглицериды (ТТГ) с высоким содержанием стеариновой кислоты могут обладать новыми свойствами, не содержать *транс*-изомеров жирных кислот и быть менее холестеринемичными, чем гидрогенизированные жиры и масла. Единственной насыщенной жирной кислотой, нейтральной относительно сывороточного холестерина, является стеариновая. Одним из объяснений этого может служить тот факт, что после всасывания стеариновая кислота быстро превращается в мононенасыщенную олеиновую кислоту. Поскольку при комнатной температуре стеариновая кислота находится в твердом состоянии, высокостеариновые соевое и каноловое масла (полученные путем антисмыслового ингибирования стеарол-АЦП-десатуразы) не требуют дегидрогенизации для насыщения связей и получения твердого при комнатной температуре спреда.

Большое число исследований в настоящее время направлено на оценку предварительных результатов, позволяющих предположить, что конъюгированная линолевая кислота (КЛК, содержащаяся в жире жвачных животных) является природным антиканцерогеном. Потенциальная польза для здоровья этой уникальной жирной кислоты обеспечивается ее антикацерогенными, антиатерогенными и антидиабетическими свойствами, а также изменением иммунологических реакций. Выявлена также связь между КЛК, эйкозаноидами и регулированием накопления жиров в адипоцитах, а также влияние КЛК на иммунную систему [15].

Основная функция α-линоленовой кислоты (АЛК) связана с ее действием как субстрата для синтеза высокомолекулярных ω-3 жирных кислот, содержащихся в рыбе, — эйкозапентаеновой (ЭПК; $C_{20:5}$) и докозагексаеновой (ДГК; $C_{22:6}$) кислот, которые присутствуют в сетчатке глаза и коре головного мозга. Предполагается, что обе эти кислоты играют важную роль в регулировании противовоспалительных иммунных реакций, артериального давления, внутриутробного развития мозга у плода и когнитивной функции

в ранний постнатальный период. Кроме того, стераидоновая кислота, ЭПК и ДГК обладают противораковыми свойствами.

Для поддержания здоровья и правильного питания важна концентрация жирных кислот (от ω-3 до ω-6) в пищевых продуктах и тканях организма. В настоящее время рацион населения стран Запада характеризуется высоким содержанием ω-6 жирных кислот и сравнительно небольшим содержанием ω-3 жирных кислот, что объясняется высоким уровнем потребления растительных жиров, богатых ω-6 жирными кислотами, и малым потреблением продуктов, богатых ω-3 жирными кислотами (например, жирной рыбы). Производство полиненасыщенных жирных кислот (особенно ω-3) в виде полуфабрикатов могло бы обеспечить присутствие столь необходимых омега-3 жирных кислот в рационе широких слоев населения, чье питание пока что не сбалансировано относительно соотношения ω-6 и ω-3 жирных кислот.

У растений основным путем получения полиненасыщенных жиров является микросомальный путь, катализируемый ω-6 десатуразой. Для образования ω-3 жирных кислот в каноловом масле использовался ген ω-6 десатуразы грибов рода *Mortierella* [89]. Превращение альфа-линоленовой и стераидоновой кислот в ЭПК, ДПК (ω-3 докозопентаеновой кислоты) и ДГК в организме человека изучалось в ходе клинических исследований, целью которых было определение сравнительной эффективности различных жирных кислот. В работе [45] отмечается, что в качестве предшественника стераидоновая кислота более эффективна, чем АЛК (в 3,6 раза). Было получено трансгенное каноловое масло с содержанием стераидоновой кислоты более 23% и общим соотношением ω-6 ω-3 кислот, равным 0,5. Масло с таким соотношением жирных кислот способствует преодолению несбалансированности рациона населения западных стран, характеризующегося высоким соотношением ω-6 : ω-3 жирных кислот. Аналогичный подход был использован для выведения пород домашнего скота, жир которых характеризуется более оптимальным жирнокислотным составом (см. раздел 18.7).

Были разработаны также специальные линии растений для получения масел, применяющихся в пищевой промышленности, в производстве моющих средств и смазочных материалов. Благодаря биотехнологиям стало возможным разрабатывать особые жиры и масла фармацевтического и животноводческого назначения. Генная инженерия масличных культур уже оказывает огромное влияние на разработку новых их сортов.

18.6.3. Микронутриенты

18.6.3.1. Витамины и минеральные вещества

Результаты клинических и эпидемиологических исследований доказывают, что некоторые микроэлементы (железо, кальций, селен, йод) и витамины (фолат, витамины Е, B_6 и А) играют важную роль в поддержании оптимального состояния здоровья, но при этом в рационе их зачастую не хватает.

Благодаря современным технологиям удается повысить содержание витамина Е в соевых бобах, кукурузе и каноле, а также β-каротина (предшественника витамина А) в различных сортах риса, восполняя тем самым дефицит этого витамина в рационе населения многих развивающихся стран. Поставлены также цели оптимизировать содержание железа (путем разработки богатого железом запасного белка), биодоступного фосфора, высвобождаемого из фитатов, и изофлавоноидов.

Как и для макронутриентов, одним из способов обеспечить адекватное присутствие в рационе полезных фитохимических соединений является оптимизация их содержания в пищевых продуктах растительного происхождения. До недавних пор сложности создавала изоляция соответствующих генов (например, для биосинтеза витаминов), однако в последние годы с появлением и развитием геномики это стало возможным. С помощью данных по геномике нутриентов был изолирован ген γ-токоферолметилтрансферазы (γ-ТМТ), превращающей малоактивные вещества-предшественники в высокоактивный α-токоферол (компонент витамина Е) [18]. Благодаря этому удалось почти в десять раз увеличить содержание витамина Е в масле из семян арабидопсиса (*Arabidopsis*). Эта методика была распространена и на такие культуры, как соевые бобы, кукуруза и канола. Витамин А — это эссенциальный микронутриент, дефицит которого характерен для населения тех стран Азии, где основным пищевым продуктом является рис. Дефицит этого микронутриента в рационе зачастую приводит к трагическим последствиям. Так, около пяти миллионов детей в странах Юго-Восточной Азии страдают так называемой ксерофтальмией (сухостью роговицы

и конъюнктивы глаза из-за нарушения слезоотделения), причем у 250 тысяч из них впоследствии развивается слепота [15]. Увеличение содержания витамина А в рационе может решить эту важнейшую проблему и (согласно данным ЮНИСЕФ) предотвратить смерть 2 млн детей, поскольку дефицит витамина А подвергает их также риску заболевания корью.

Основным пищевым продуктам почти для половины населения Земли служит рис, однако в шлифованном рисе полностью отсутствует β-каротин и его предшественники (каротиноиды). В 1990-х гг. ученым удалось клонировать большинство растительных ферментов для биосинтеза каротиноидов, и было обнаружено, что незрелый эндосперм риса способен синтезировать промежуточный продукт для последующего биосинтеза β-каротина [93]. Используя гены метаболизма каротиноидов у нарцисса и бактерии рода *Erwinia*, а также транзитный пептид *Rubisco* (рибулозобисфосфаткарбоксилазу, фермент, связывающий CO_2), ученые обеспечили синтез β-каротина в эндосперме риса. Этот крупнейший прорыв привел в дальнейшем к разработке «золотого риса» и доказал, что важнейшая стадия биосинтеза провитамина А может быть сконструирована и для «незеленых» частей растений, в которых обычно отсутствуют каротиноидные пигменты. Аналогичный метод был применен фирмой *Monsanto* для синтеза β-каротина в каноле.

Чаще всего в рационе человека наблюдается дефицит железа (это характерно для трети населения земного шара). Наиболее часто распознаваемым симптомом дефицита железа в организме является анемия из-за низкого содержания гемоглобина, однако возникают и более серьезные проблемы, в том числе нарушение у детей способности к обучению, повышенная подверженность инфекциям и снижение работоспособности. Для контроля эндосперм-специфичного промотора использовался ген ферритин из богатого железом резервного белка сои [35, 69]. В зерне такого трансгенного риса содержалось в три раза больше железа, чем в обычном рисе. Для дальнейшего увеличения содержания железа в зерне ученым предстоит выяснить, как именно происходит транспорт железа в растении [54]. Примеры сельскохозяйственных растений с генно-модифицированными макро- и микронутриентами, способных оказать положительное воздействие на здоровье человека и домашних животных, представлены в табл. 18.4 [15].

Таблица 18.4

Некоторые генно-модифицированные сельскохозяйственные культуры с улучшенными функциональными свойствами. По [14]

Культура/Вид	Признак	Трансген
Люцерна	Наличие фитаза	Фитаза (из *Aspergillus*)
	Наличие ресвератрола	Ресвератролсинтаза
	Повышенное содержание лигнина	Трансген, снижающий содержание 3-О-метитрансферазы кофеиновой кислоты и каффеоил СоА-3-О-метилтрансферазы
Арабидопсис и табак	Наличие катехола	Салицилатгидроксилаза *(nahG)*
Сахарная свекла	Наличие фруктанов	1-сахароза:фруктозилтрансфераза сахарозы
Канола	Повышенное содержание витамина Е	γ-токоферол-метилтрансфераза (из арабидопсиса)
	Повышенное содержание лауриновой кислоты	Лауроил-АЦП-тиоэстераза (из калифорнийского лавра)
	Повышенное содержание γ-линоленовой кислоты	ω-6- и ω-12-десатуразы
	Наличие ω-3 жирных кислот	Ген ω-6 десатуразы (из *Mortierella*)
	Наличие β-каротина	Фитоенсинтаза (из нарцисса)
		Фитоендесатураза (из бактерий рода *Erwinia*)
		Ликопинциклаза (из нарцисса)
	Повышенное содержание ЖКСДЦ $C_{8:0}$ и $C_{10:0}$	Ch FatB2, тиоэстераза кДНК (*из Cuphea hookeriana*)
Кассава	Пониженное содержание цианогенных гликозидов	Гидроксинитриллиаза

Таблица 18.4 (продолжение)

Культура/Вид	Признак	Трансген
Хлопок	Повышенное содержание олеиновой кислоты	Мутантная ω-12 десатураза
	Хлопковое масло с высоким содержанием олеиновой и стеариновой кислот	*PTGS*-десатураза с высокополимерной РНК
Кофе	Повышенное содержание кофеина	Антисмысловая ксантозин-N-Т-метилтрансфераза (из кофе)
Люпин	Повышенное содержание метионина	Альбумин из семян (подсолнечника)
Кукуруза	Повышенное содержание метионина	Стабильность иРНК обеспечивается интронным переключением мишени *Dzr*1
	Пониженное содержание фумонизина	Деэстераза + деаминаза (μ-биальные)
	Устойчивость к насекомым	Авидин (куриный)
	Повышенное содержание белка с более предпочтительным аминокислотным составом	α-лактальбумин (свиной)
	Повышенное содержание серосодержащих аминокислот	Кукурузный зеин (15 кДа)
	Повышенное содержание витамина С	Дегидрооаскобатредуктаза (ДГАР, из пшеницы)
Картофель	Повышенное содержание крахмала	АДФ-глюкоза-пирофосфорилаза (из *E. coli*)
	Повышенное содержание высокоамилозного крахмала	Ингибирование генов *SBE* (глюканветвящего фермента) *A* и *B*
	Повышенное содержание молекул инулина	Гены артишока (*Cynara scolymus*) — 1-SST (сахароза: сахароза-1-фруктозилтрансфераза) и 1-FFT (фруктан:фруктан-1-фруктозилтрансфераза)
	Наличие богатого серой белка	Неаллергенный засевной ген альбумина из *Amaranthus hypochondriacus*
	Пониженное содержание соланина	Антисмысловой ген стеролгликотрансферазы
Рис	Наличие β-каротина	Фитоен-синтаза (из нарцисса)
		Фитоен-десатураза (из *Erwinia*)
		Ликопинциклаза (из нарцисса)
	Повышенное содержание железа	Ферритин (из фасоли *Phaseolus*)
		Металлотионеин (из риса)
		Фитаза (мутантная, из *Aspergillus)*
	Снижение содержание аллергенного белка	Антисмысловой аллерген (16 кДа, из риса)
	Наличие пуроиндолиновых соединений: размягчение зерен, возможность более тонкого помола, меньше повреждается крахмал	Гены пуроиндолина из пшеницы
Сорго	Улучшение усвояемости кормов	Мутированный коричневый пигмент (*Bmr*) кодирует О-метилтрансферазу кофеиновой кислоты (фермент, необходимый для образования лигнина)
Соевые бобы	Улучшение аминокислотного состава	Синтетические белки
	Повышение содержания серосодержащих аминокислот	Оверэкспрессирование зеина (кукурузного белка, 15, кДа)
	Повышение содержания олеиновой кислоты	ω-12-десатураза (из соевых бобов, смысловая супрессия)
		Рибозимная терминация РНК транскрибирует понижение содержания засевной жирной кислоты
	Снижение содержания иммуннодоминантного аллергена	Генный сайленсинг цистеинпротеазы Р34 (34 кДа)

Таблица 18.4 (окончание)

Культура/Вид	Признак	Трансген
Соя/арабидопсис	Наличие и увеличение содержания изофлавонов	Изофлавонсинтаза
Батат	Повышение содержания белка	Ген искусственного запасного белка (*ASP*-1)
Томаты	Повышение содержания провитамина А и ликопина	Ликопинциклаза (из арабидопсиса)
	Повышение содержания провитамина А	Фитоендесатураза (из *Erwinia*)
	Повышение содержания флавоноидов	Халконизомераза (из *Petunia*)
	Повышение содержания ликопина	Накопление генно-модифицированного полиамина
Пшеница	Повышение содержания глютенинов	Гены высокомолекулярных субъединиц
	Повышение содержания кофейной и феруловой кислот	Ген пшеницы

18.6.3.2. Фитохимические вещества

Поиск новых веществ, помогающих предотвратить и/или лечить заболевания, привел к появлению специализированных биотехнологических фирм, занятых изучением и разработкой нутрицевтиков. Чтобы те или иные вещества при их приеме с пищей оказывали терапевтическое воздействие, необходимо не только менять пищевые предпочтения населения или напрямую обогащать микронутриентами сельскохозяйственное сырье, но и совершенствовать систему поставок пищевых продуктов, однако максимальное потребление нутриентов с пищей не всегда коррелирует с оптимальной пищевой ценностью такого рациона [3]. Например, известно, что флавоноид кверцетин в небольших концентрациях обеспечивает оптимальную защиту от пролиферации раковых клеток и действия канцерогенного *PhIP* (2-амино-1-метил-6-фенилимидазо[4,5*b*]пиридина), содержащегося в готовых мясных блюдах, однако при повышении концентрации его действие ослабляется. После активизации этого канцерогенного *PhIP* в печени он атакует ДНК и образует ДНК-аддукт. Кверцетин ингибирует образование ДНК-аддукта, причем его действие зависит от дозы. Предполагается, что аналогичными свойствами обладают и другие флавоноиды — это можно будет подтвердить после разработки эффективной процедуры оценки пищевых систем. Все это свидетельствует о необходимости самого серьезного отношения к исследованиям фитохимических веществ и к правомерности оценки их действия по принципу «чем больше, тем лучше».

О полезных свойствах фитохимических веществ (в отличие от витаминов и минералов) свидетельствуют результаты эпидемиологических исследований. Точный химический состав многих активных компонентов еще не определен, однако для отдельных групп фитохимических веществ (например, для не обладающих свойствами провитамина А каротиноидов, глюкозинолатов и фитоэстрогенов) активные вещества уже установлены и достаточно изучены. Ирония природы состоит в том, что естественный обмен веществ в организме с участием кислорода происходит с образованием огромного количества токсичных соединений — так называемых «свободных радикалов», которые изменяют молекулы белков и жиров, повреждают ДНК и клетки организма. Вредное воздействие свободных радикалов можно ослабить или предотвратить с помощью антиоксидантов.

Данные эпидемиологических исследований заставляют предположить, что растения рода капустных (*Brassica*) обладают защитными свойствами от рака легких и органов пищеварения. Растения семейства крестоцветных, к которым относится и род капустных, служат источником глюкозинолатов — большой группы серосодержащих глюкозидов, которые до контакта с ферментом мирозиназой остаются в неизмененном виде (этот фермент может попадать в субстрат при технологической переработке, при пережевывании или от насекомых). Мирозиназа высвобождает глюкозу и расщепляет соединения, содержащие изотиоцианаты. Эти высокоактивные вещества являются *in vitro* мощными индукторами ферментов второй фазы (защитных ферментов, см. главу 12). Изотиоцианаты также ингибируют митоз (деление клеток) и стимулируют апоптоз опухолевых клеток человека *in vitro* и *in vivo* [47]. В настоящее время изучаются хемозащитные противораковые свойства *I3C* (индол-3-карбинола), в том числе для профилактики мастопатии; предполагается также, что повышение образования метаболитов 2-гидроксилированных произво-

дных эстрогена (катехола) имеет противораковый эффект [15]. Бактериальный ген салицилатгидроксилазы *(nahG)* был перенесен в растения арабидопсиса и табака [27], где он успешно превращает салициловую кислоту в катехол. Этот результат позволяет разработать механизм модификации съедобных растений с присутствием какого-либо предшественника салициловой кислоты.

Помимо обладающего антиоксидантными свойствами витамина А, еще одним интересным продуктом метаболизма каротиноидов является ликопин, положительно влияющий на работу сердечно-сосудистой системы и снижающий содержание окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). По данным эпидемиологических исследований этот каротиноид может быть потенциально полезен для здоровья из-за снижения риска рака простаты, особенно тяжелых его форм с летальным исходом. Результаты пяти проведенных исследований подтвердили, что при увеличении потребления переработанных томатов или ликопина в сочетании с потреблением жиров достигается снижение риска на 30–40% (исследования потребления непереработанных томатов таких выводов сделать не позволяют) [33]. В работе [58] использовался трансгенный метод модификации полиаминов в томатах, что позволяло замедлить процесс их созревания. Стебли трансгенных растений жили дольше, что заставляет предположить, что полиамины действительно замедляют процесс созревания. Содержание ликопина в генно-модифицированных томатах оказалось на удивление высоким и было в 2–3,5 раза выше, чем в обычных томатах. Обычными методами такого результата добиться невозможно, и этот инновационный подход может применяться и к другим овощам и фруктам.

Серьезное внимание в настоящее время привлекают изофлавоны, особенно генистеин и дайдзеин (природные соединения, входящие в состав растительных тканей), благодаря их потенциальной пользе для здоровья. Они содержатся почти исключительно в сое и других растениях семейства бобовых. Эти вещества играют роль сигнальной молекулы в установлении симбиотической связи между растением и ризобиальными бактериями, в результе чего образуются удерживающие азот корневые клубеньки. Положительное влияние этих веществ на здоровье человека обусловлено их эстрогенной и антиканцерогенной активностью, участием в защите от артерогенного окисления ЛПНП и в увеличении костной массы. Несмотря на то что причины такого действия еще полностью не установлены, вполне возможно, что одним из факторов является слабая эстрогенная активность изофлавонов (иногда называемых фитоэстрогенами). В зависимости от сорта и региона выращивания количество и потери изофлавонов при производстве традиционных соевых и белковых продуктов оказываются разными. Решением проблемы оптимального содержания изофлавонов в пищевых продуктах может оказаться повышение их содержания в растительном сырье и снижение вариабельности концентраций в посевном материале. Изофлавоны синтезируются по фенилпропаноидному пути (рис. 18.15) со множеством ответвлений и образованием многочисленных вторичных метаболитов, в том числе лигнинов, флаванолов, антоцианинов и некоторых фитоалексинов [49]. Важнейшим ферментом, инициирующим синтез изофлавоноидов, является специфичная для бобовых изофлавонсинтаза (ИФС).

Модификация гена ИФС может обеспечить возможность манипуляции в рамках фенилпропаноидного пути и использоваться в решении задач как сельского хозяйства, так и повышения пищевой ценности продуктов. В 2007 г. были получены генно-модифицированные соевые бобы, содержание изофлавонов в которых было примерно в четыре раза выше, чем в дикой сое.

В некоторых растениях (например, в сосне, винограде, арахисе, ревене) содержатся фенольные фитохимические вещества — стильбены, в том числе ресвератрол. Источники ресвератрола в рационе человека — это пищевые продукты и напитки из винограда (собственно виноград, изюм, красное вино). Ресвератрол вызывает серьезный интерес как вещество, благотворно влияющее на здоровье человека, — это хороший антиоксидант, ингибирующий агрегацию тромбоцитов и способствующий улучшению работы сердечно-сосудистой системы. Показано, что он обладает «хемопревентивным» действием, предотвращая опухолеобразование в биопробах кожи мышей, то есть он может замедлять развитие злокачественных опухолей и у человека [46]. Способность накапливать ресвератрол была придана генетическими методами листьям и стеблям люцерны [43].

Некоторые примеры других исследуемых фитохимические веществ были приведены выше в табл. 18.3. Несмотря на то что появляется все больше данных, свидетельствующих о снижении риска некоторых заболеваний (в том числе отдельных видов онкологии, сердечно-сосудистых и связанные со старением

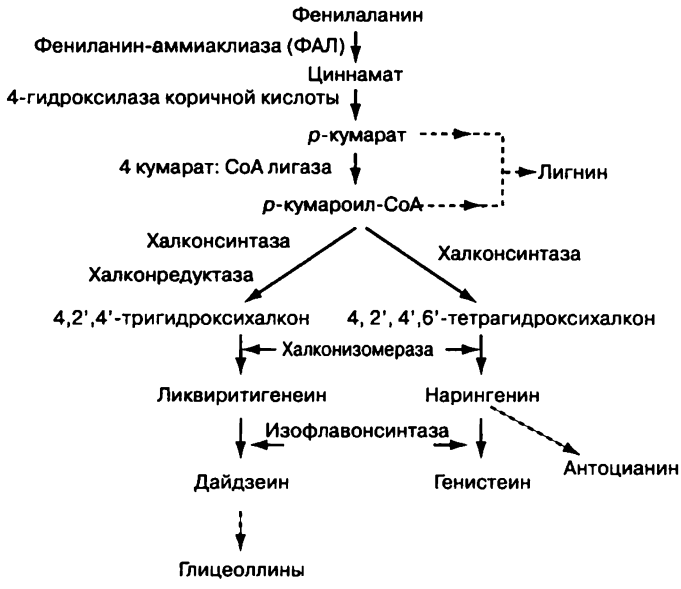


Рис. 18.15. Упрощенная схема фенилпропаноидного пути синтеза изофлавонов с указанием промежуточных метаболитов и участвующих ферментов

хронических дегенеративных заболеваний) при увеличении потребления тех или иных фитохимических веществ, для доказательства существования непосредственной взаимосвязи между потреблением этих веществ и заболеваемостью необходимо проведение дальнейших исследований.

18.6.3.3. Антинутриенты

В растениях образуется множество фитохимических веществ и формируются другие защитные механизмы от вредных воздействий. Так, фитат (запасной фосфат растительного происхождения) является своего рода «антинутриентом», поскольку он образует хелатные комплексы с железом, кальцием, цинком и другими двухвалентными ионами минеральных веществ, препятсвуя их усвоению организмом. У нежвачных животных обычно отсутствует фермент фитаза, необходимый для усвоения фитата. В большинстве стран к кормам для птиц и свиней добавляют порошкообразные минеральные фосфаты, способствующие оптимальному росту и развитию животных. Избыток фосфата выводится с экскрементами и загрязняет воду. При использовании соевой муки с пониженным содержанием фитата в сочетании с кукурузой (также содержащей мало фитата) содержание фосфатов в навозе снижается вдвое.

Разработан ряд трансгенных линий риса, позволяющих решить эту проблему [69]. Один из путей — это снижение содержания фитата в эндосперме риса благодаря внедрению грибкового гена из *Aspergillus fumigatus*, обусловливающего продуцирование термостойкой фитазы. Этот фермент выдерживает кипячение и имеет два оптимальных значения pH — кислотное, соответствующее pH желудка, и щелочное, соответствующее pH кишечника. В целях улучшения повторного всасывания железа был сконструирован ген белка металлотионеинового типа, и в 1999 г. на американском рынке появилась «низкофитатная» кукуруза [91]. Данные ряда исследований свидетельствуют, что белок из низкофитатной сои усваивается несколько лучше, чем из обычных соевых бобов. В работе [1] описано создание генно-модифицированной люцерны, продуцирующей фитазу. Эксперименты по добавлению в корма для птицы этих трансгенных растений дали лучшие результаты, чем при использовании популярной промышленной добавки с фитазой. Если в рацион животных включена фитаза, то оптимальное состояние и минерализация костей достижимы и при рационе без фосфатных добавок [52]. При использовании в кормах трансгенной люцерны птица хорошо растет даже без добавок неорганического фосфора, что доказывает возможность увеличения биодоступности столь необходимого животным фосфора с помощью растений и исключения из состава кор-

мов добавок фосфора. Это, в свою очередь, позволит снизить себестоимость продукции и уменьшить загрязнение окружающей среды.

Ученые ищут способы снижения содержания в сое и других антинутриентов — ингибиторов образования трипсина, лектинов и некоторых термостойких компонентов. При этом следует учитывать, что из-за исключения нативных токсических веществ повышается риск подверженности растений болезням и повреждениям вредителями, так что базовая идиоплазма должна изначально обладать соответствующими свойствами. Снижение содержания в сое ингибиторов трипсина может положительно повлиять на развитие местной промышленности комбикормов и сделать ее конкурентоспособной на рынке белковых кормов. В сочетании с повышением содержания эссенциальных аминокислот это позволит существенно увеличить производство кормов.

18.6.3.4. Аллергены

Симптомы непереносимости пищевых продуктов хорошо известны, но истинная пищевая аллергия встречается довольно редко [86]. Пищевая аллергия отличается от непереносимости и других нарушений пищеварения тем, что при аллергии образуются антитела (иммуноглобулин Е, *IgE*) и вырабатывается гистамин и родственные ему соединения. Иммунная система реагирует на усвоение того или иного пищевого продукта или его компонента. Симптомы могут быть локализованы в желудке и кишечнике, но после всасывания компонентов продукта они могут распространиться и на весь организм. Обычно симптомы проявляются очень быстро — почти всегда они становятся заметными через несколько часов после еды. Подробно описаны истинные аллергены, принадлежащие к белкам суперсемейства купинов (к которым относятся глобулины орехов и бобовых, а также альбумины орехов) и суперсемейства проламинов зерновых, а также некоторые другие вещества (например, геверин, вызывающий контактный дерматит при контакте с латексом и хитиназами) [86].

К пищевым продуктам, зачастую вызывающим плохое всасывание и другие симптомы пищевой непереносимости (помимо непосредственных иммунных реакций), относятся пшеница и прочие глютенсодержащие зерновые. Целиакия или глютензависимая энтеропатия — это полифакторное расстройство, вызываемое неправильным откликом организма на употребление глютенсодержащих продуктов и обусловленное Т-лимфоцитами. Оно приводит к хроническому воспалению кишечного тракта с характерной атрофией ворсинок и нарушением всасывания [15]. Кроме того, зачастую причиной пищевой аллергии является употребление коровьего молока (из-за непереносимости лактозы), а также продуктов на основе кукурузы. Современные данные свидетельствуют, что для улучшения качества продуктов можно использовать тиоредоксин, который снижает аллергенность и улучшает усвояемость. Тиоредоксин расщепляет дисульфидные связи аллергенов, преобразуя группу S—S в 2 SH-группы, и тем самым изменяют аллергенные свойства дисульфидных белков пшеничной муки. Путем изменения экспрессии гена тиоредоксина удалось уменьшить аллергенное воздействие пшеницы и других злаковых в экспериментах на собаках.

К антинутриентам соевой муки и соевых пищевых продуктов относят ингибиторы трипсина, лектины и несколько других термостойких компонентов. Основным антинутриентом данного источника белка является ингибитор трипсина, а поскольку он представлет собой белок с высоким содержанием серы, то в основных аминокислотах, особенно серосодержащих, будет ощущаться недостаток линий, не содержащих ингибитор трипсина или содержащих его в незначительном количестве. Эта проблема решается путем внедрения белка *Mb*1 (см. выше).

У людей, чувствительных к сое, до 85% *IgE*-реакций приходится на долю запасного соевого белка сои. Сильнейшим аллергеном в сое является глицин *Gly m Bd 30K (*обозначаемый также *P*34), имеющий молекулярную массу 34 кДа и относящийся к суперсемейству цистеинпротеаз. Для исключения аккумуляции белка P34 в трансгенной сое был использован сайленсинг гена с помощью специфичного промотора β-конглицина, что позволило убрать из сои основной аллерген. Первые результаты исследования сыворотки крови человека показали, что после такого сайленсинга и потребления соевого продукта *P*34-специфичные антитела *IgE* не выявляются [40, 41]. Снижение содержания аллергенов и ингибиторов трипсина, а также существенное снижение содержания аминокислот в соевых бобах может оказать позитивное влияние на развитие комбикормовой промышленности.

18.6.3.5. Токсины

Поскольку растения для защиты от вредителей продуцируют большое число фитохимических веществ, они не всегда полезны для человека. За многие годы скрещивания и искусственного отбора большинство генов, участвующих в продуцировании токсинов, было удалено из растений, потребляемых в пищу и используемых в качестве кормов для животных. Так, картофель и томаты принадлежат к семейству пасленовых (*Solanaceae*) и могут продуцировать токсичные гликоалкалоиды (в том числе соланин), которые ассоциируют с заболеванием «спина бифида»* [26]. От отравления цианогенными гликозидами кассавы (маниоки) ежегодно умирает несколько человек [37]. Для снижения активности и даже полного исключения генов, участвующих в продуцировании этих токсинов в растениях, их аккумуляции и/или активации, можно применять методы биотехнологии. Так, антисмысловым методом уже удалось существенно снизить содержание соланина в картофеле. Ведутся поиски путей снижения содержания и другого важного алколоида картофеля — хаконина [57]. Снизить содержание в кассаве цианогенных гликозидов удалось путем экспрессии гидроксинитриллиазы (фермента кассавы) в корнях растения [80].

18.6.4. Перспективы биотехнологии сельскохозяйственных культур

Дефицит микроэлементов и витаминов в рационе населения разных стран и пути обеспечения необходимого их содержания очевидны. Стратегию совершенствования состава питательных веществ в рационе разрабатывают на основе определения верхнего предела допустимого содержания каждого нутриента. Вместе с тем полезные свойства доказаны далеко не для всех фитохимических веществ, и только в случае их выявления можно будет точно определить, какой компонент или компоненты должны стать объектом разработки и какие культуры должны стать предметом модификации. Поскольку для этого необходимы данные по биохимии, физиологии растений, человека и животных, а также по химии пищевых продуктов, то для производства безопасных и здоровых пищевых продуктов необходима междисциплинарная кооперация специалистов по биохимии, физиологии растений, нутрициониcтов и ученых-пищевиков.

18.7. Животноводство

Появление возможности модифицировать животных на молекулярном уровне усилила роль сырья животного происхождения в оценке способов лечения некоторых заболеваний и в «генно-модифицированний фармацевтике», в том числе путем введения в молоко ценных нутриентов. Трансгенные животные стали неоценимым объектом исследований в области биологии и животноводства, поскольку для решения прежде не разрешимых научных проблем их модификацию можно проводить целенаправленно.

Несмотря на появление вполне успешной технологии «ядерной передачи» (переноса ядра соматической клетки; первое клонированное животное — известная «овечка Долли»), наибольшее распространение получил метод получения трансгенных животных путем микроинъекций ДНК в пронуклеос недавно оплодотворенной яйцеклетки (рис. 18.16). При помощи таких антисмысловых трансгенных технологий (когда для отключения экспрессии используется обратная копия фрагмента ДНК) в настоящее время стало возможным добавлять в геном новые гены, увеличивать уровень экспрессии гена или уменьшать синтез определенных белков [81]. Дополнительное преимущество технологии ядерной передачи — это возможность убирать или изменять существующий ген путем гомологической рекомбинации.

18.7.1. Методы получения трансгенных животных

Процесс получения трансгенных животных можно разделитть на следующие этапы:

внедрение ретровирусных векторов в эмбриональные клетки на ранней стадии развития;

ретровирусное инфицирование ооцитов зародышевого пузырька;

инъекция ДНК в пронуклеус только что оплодотворенной яйцеклетки;

---

* *Spina bifida* —порок развития позвоночника, представляющий собой неполное закрытие нервной трубки в неполностью сформированном спинном мозге плода. — *Примеч. ред.*



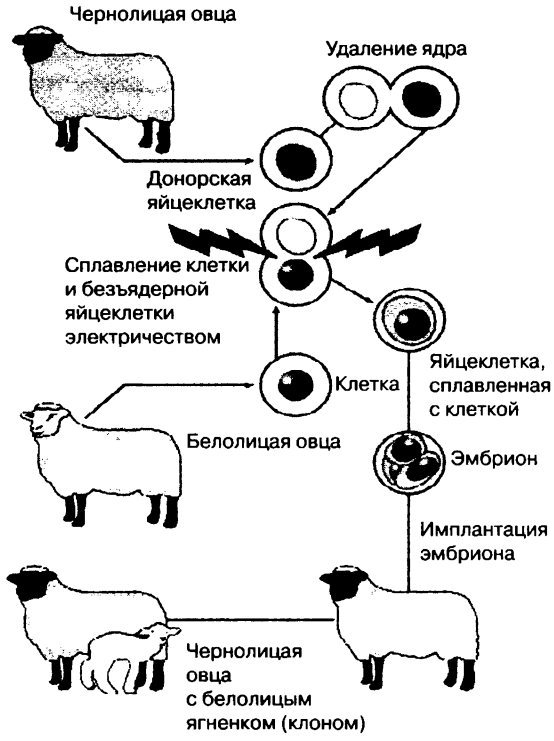


Рис. 18.16. Овечка Долли и ее «мать». С разрешения Йана Вилмута (*Ian Wilmut*)

инкорпорация генно-модифицированных эмбриональных стволовых клеток в эмбриональные клетки на ранней стадии развития;

инкорпорация генно-модифицированных примордиальных клеток в эмбриональные клетки на ранней стадии развития;

проникновение спермия;

- трансплантация ядра;

инжекция микрочастиц (баллистическая трансфекция).

Трансгенные методы применялись к разным видам животных — овцам, козам, свиньям, птицам, даже к рыбам. Трансгенные исследования на животных можно разделить на медицинские и сельскохозяйственные. Одним из последних направлений исследований, которые можно отнести и к той, и к другой группе, является изучение возможности использовать животных в качестве биореакторов для получения ценных молочных белков. За этими исследованиями скрывается более фундаментальная задача, а именно более полное изучение молекулярных и физиологических основ экспрессии генов и развития животных, что должно помочь в совершенствовании методов генной инженерии.

Вместе с тем до сих пор не сняты ограничения на расширение применения трансгенных технологий на всех животных за исключением мышей [66]. Эти ограничения связаны, во-первых, с недостатком знаний о генетической основе факторов, лимитирующих воспроизводство тех или иных признаков; во-вторых, с выявлением тканей и специфичных для развития регуляторных последовательностей, которые можно было бы использовать для разработки генных конструктов, векторов экспрессии и для направленного воздействия на ген; в-третьих, с необходимостью разработки новых методов повышения эффективности получения трансгенных животных.

В медицине наиболее универсальной экспериментальной моделью служат мыши, и технологии получения генно-модифицированных мышей разработаны довольно подробно. До недавнего времени принципиальным преимуществом мышей перед другими видами животных была возможность сравнительно легко изолировать ее поддающиеся конструированию эмбриональные стволовые клетки. Эти клетки по-

лучают из внутренней клеточной массы бластоциста (зародышевого пузырька), формирующегося на ранней стадии эмбриогенеза. В отличие от других стволовых клеток эмбриональные клетки являются плюрипотентными, то есть способными развиться практически в любые клетки и ткани организма. Поскольку они экспрессируют теломеразу, то эти клетки являются самовосстанавливающимся, потенциально неиссякаемым источником новых клеток. Одним из преимуществ использования мышей является возможность с помощью эмбриональных стволовых клеток точно попадать в определенные области хромосомы при так называемой гомологической рекомбинации. Благодаря этому методу появились возможности внедрять в геном новый чуждый ген (например, для улучшения липидного состава молока), модифицировать эндогенный ген или стирать участок специфичного эндогенного гена, создавая мутант с «утерянной функцией гена» (с так называемым «выбитым геном»), что необходимо для изучения фенотипического действия инактивированных генов.

До 1998 г. изоляция эмбриональных стволовых клеток животных казалась делом труднодостижимым, однако в краеугольной работе [87] Джеймс Томсон *(James Thomson)* из Университета Висконсин-Мэдисон сообщил об успешной изоляции, извлечении и поддержании культуры эмбриональных стволовых клеток человека (*hES*). Хотя это и не является предметом данной главы, следует отметить, что переход от изучения стволовых клеток мыши к стволовым клетками человека стал настоящим прорывом в науке. Перефразируя Томсона, можно сказать, что эти клетки отличаются от всех стволовых клеток человека, изолировать которые удалось до настоящего времени, и могут стать источником получения всех видов клеток, найдя применение в трансплантационной медицине, в разработке лекарств и в онтогенетике человека.

18.7.2. Использование трансгенных животных

Животноводство с использованием трансгенных животных развивается с 1985 г. Большое внимание при этом уделяется генным конструктам, связанным с развитием животных, однако до сих пор не удалось создать идеальные фенотипы роста из-за невозможности координированно регулировать экспрессию генов и получать каскадную последовательность эндокринных событий. При использовании микроинъекций ДНК повышенное внимание уделяется типам генной и регуляторной последовательности у модифицированных животных. В настоящее время выделяют две большие группы трансгенов: регулирующие факторы роста и белки, продуцируемые в молочных железах животных. Трансгенные животные используются в животноводстве в следующих целях:

улучшение качества мяса и молока;

улучшение технологических характеристик животного сырья (например, в производстве сыра);

получение ценных белков молока и крови;

сохранение редких видов животных и животных, находящихся под угрозой исчезновения;

преодоление межвидовых барьеров.

Внедрение факторов роста меняет эффективность производства мяса и распределение источников нутриентов в сторону увеличения производства нежирного мяса. Наиболее крупный класс трансгенов сельскохозяйственных животных образуют предназначенные для экспрессии (прямой или опосредованной) генные конструкты различных факторов роста, которые меняют строение организма. Большинство этих трансгенов экспрессируют гормон роста (соматотропный гормон, СТГ), однако нашли применение и другие конструкты на основе СТГ и фактора роста-I инсулинового типа (*IGF*-1). Как правило, свиньи и овцы, экспрессировавшие данные конструкты, давали менее жирное мясо и более эффективно усваивали корм, но у них отмечались осложнения из-за высокой нерегулируемой циркуляции гормона роста, а это свидетельствует о необходимости более строгого контроля секреции гормона. В конце 1990-х гг. проводились предварительные исследования по получению трансгенных (по СТГ и *IGF*-1) свиней с улучшенными показателями роста [71], в результате которых удалось получить желаемый эффект по росту и конституции животных без очевидных аномалий. Это позволяет надеяться, что в будущем такие животные станут доступными для свиноводов.

Одной из основных целей генной инженерии в области повышения продуктивности скота является увеличение надоев молока и изменение состава молочного жира, то есть снижение содержания в нем насыщенных жирных кислот и увеличение доли «полезных» жирных кислот. Как мы уже отмечали в разделе

18.6, слишком высокое содержание полинасыщенных омега-6 жирных кислот и высокое соотношение ω-6 и ω-3 жирных кислот способствует патогенезу многих заболеваний (в том числе сердечно-сосудистых, онкологических и т. п.). Более равномерное их распределение или уменьшение соотношения ω-6 и ω-3 жирных кислот снижает риск возникновения этих заболеваний. Таким образом, для здоровья человека большое значение имеет сбалансированность ω-6 и ω-3 жирных кислот в рационе и в организме. Организм млекопитающих не вырабатывает ω-3 жирные кислоты из более распространенных ω-6 жирных кислот, и поэтому содержание ω-3 жирных кислот зависит от их поступления с пищей. Показано, что у мышей вживленный ген *fat*-1 от *C. elegans* добавляет еще одну двойную связь в цепь ненасыщенной жирной кислоты и превращает ω-6 жирную кислоту в ω-3 [50]. Тем самым в органах и тканях этих мышей повышается содержание полезных для здоровья ω-3 жирных кислот и снижается содержание ω-6 жирных кислот. Это позволяет не только исследовать роль ω-3 жирных кислот в организме, но и свидетельствует, что данную технологию можно адаптировать для обогащения ω-3 жирными кислотами пищевых продуктов животного происхождения (мяса, молока и яиц).

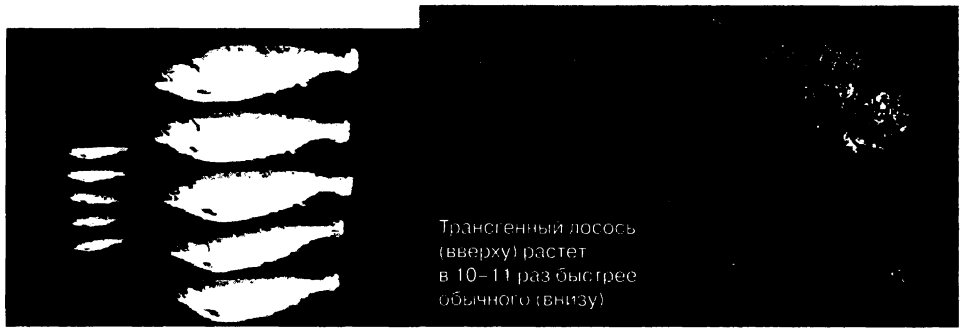
Современные биотехнологические методы исследования сельскохозяйственных животных ориентированы в основном на молочное животноводство. Можно ожидать, что примерно через 20 лет появятся генно-модифицированные молочные породы коров. Скорее всего, это будут генно-модифицированные животные двух типов: 1) животные, у которых добавлен или изменен молочный белок, что позволит увеличить производство сыров и ассортимент молочных продуктов; 2) животные, которые будут давать более полезное для человека молоко. В первом случае увеличение экспрессии каппа-казеина (и/или α_{s1}-казеина) или уменьшение экспрессии α-лактоглобулина позволит получать животных, молоко которых будет предназначено для последующей переработки в молочные продукты. Во втором случае молоко будет иметь улучшенный жирнокислотный состав, причем таких животных (коз) уже удалось получить [55].

18.7.3. Рыбоводство

Работы в области генной инженерии рыб продвигаются гораздо более быстрыми темпами, чем в области птицеводства. Метод переноса генов уже использовался для многих гидробионтов (как позвоночных, так и беспозвоночных). Эксперименты с переносом генов призваны решить многие задачи, в том числе по изучению структуры и функции генов, по аквакультуре и в программах менеджмента рыбоводческих хозяйств. Поскольку для рыб характерны высокая плодовитость, крупные яйцеклетки и отсутствие необходимости в реимплантации эмбрионов, трансгенная рыба служит хорошей моделью для изучения экспрессии генов. Трансгенная аквариумная рыбка данио уже давно стала объектом для изучения эмбриогенеза — экспрессия трансгенов позволяет проследить последовательности поколений клеток и изучать промоторы и структурные функции генов. На менее популярных, чем данио, медаках (оризиях) и золотых рыбках изучаются функции промотора. Все это свидетельствует о том, что трансгенная рыба является очень полезной моделью экспрессии генов, довольно надежно воспроизводящей процессы у позвоночных.

Большинство экспериментов в области переноса генов у рыб направлены на получение генно-модифицированных разновидностей для воспроизводства в аквакультуре. Основная область научных исследований — это повышение эффективности роста рыбы. Первые образцы трансгенных по гормону роста рыб продемонстрировали возможность ускорения роста и получения улучшенных фенотипов. Наиболее эффективным оказался метод микроинъекций ДНК благодаря сравнительной простоте работы с эмбрионами. Группа ученых под руководством Боба Девлина (*Bob Devlin*) из Канадского Университета Британской Колумбии (г. Ванкувер) [20] добилась потрясающих показателей скорости роста кижуча, в которого перенесли ген гормона роста нерки (рис. 18.17). Трансгенная рыба за 6 мес. превзошла по размеру однопометных рыб дикого типа в 11 раз и достигла зрелости в два раза быстрее. Эта рыба была отнюдь не аномальных размеров, как иногда сообщалось, — просто она достигла размеров взрослой особи более чем в два раза быстрее, чем ее «братья» и «сестры». В кормовых отделениях наблюдалось интересное поведение рыб, поскольку быстрый рост трансгенных особей порождал сильный аппетит и потребность в постоянном кормлении. Оставленные «на произвол судьбы» и вынужденные искать пропитание самостоятельно, эти рыбы не выдерживали конкуренции и вытеснялись своими «более умными» дикими собратьями.

По данным большинства исследований (например, по атлантическому лососю и американскому сому) темпы роста трансгенной рыбы увеличиваются на 30–60%. Помимо уже упоминавшихся видов рыб, гены



Рыба как оптимальный объект генной инженерии:

метает больше икры;
аквакультура — один из наиболее развивающихся секторов производства пищевых продуктов;
с 1984 г. ежегодный прирост производства в аквакультуре составляет 10%,
тогда как производство мяса увеличивается лишь на 3%;

по данным ФАО (2000 г.) рост производства в рыбоводческих хозяйствах составил 1,6%;

реализация продуктов аквакультуры выросла в США с $45 млн в 1974 г.
до более чем $978 млн в 1998 г. (по данным National Agricultural Statistics Service за 2000 г.)

Рис. 18.17. Трансгенный лосось (кижуч). С разрешения Боба Девлина (*Bob Devlin*)

гормона роста переносились в полосатого окуня, тилапию, радужную форель, морского карася, карпа, вомера, гольца и другие виды.

Еще одна область исследований — это разработка линий трансгенных животных для использования их в качестве биореакторов. Одна из основных целей так называемой «фармацевтической генной инженерии» — это направленная экспрессия трансгенов, кодирующих биологически активные белки человеческого организма. В этой сфере основной целью является получение из сыворотки крови, мочи или грудного молока больших количеств функциональных белков, имеющих терапевтическое значение. В настоящее время в молочные железы коз, овец, крупного рогатого скота и свиней успешно перенесена экспрессия чуждых генов, кодирующих лизоцим, альфа-1-антитрипсин (ААТ), тканевой активатор плазминогена, фактор свертывания крови IX, протеин С и т. п. Поскольку вопросы получения фармацевтических препаратов выходят за рамки этой главы, мы на них останавливаться не будем.

Биотехнологии, в частности трансгенная биотехнология, в последнее десятилетие активно развиваются и применяются в животноводстве. В отличие от пищевой промышленности наиболее активно и интенсивно финансируемой областью исследований является получение трансгенных животных как биореакторов для получения рекомбинантных белков человеческого организма. Вместе с тем себестоимость получения трансгенных животных, особенно для мясного и молочного животноводства, довольно высока из-за огромных затрат. Успешное разведение трансгенных сельскохозяйственных животных требует создания соответствующих помещений для содержания животных и организации специализированных междисциплинарных коллективов специалистов — эмбриологов, ветеринаров, зоологов и специалистов в области молекулярной биологии. Темпы развития и успешность трансгенных технологий во многом зависят от применения многочисленных классических репродуктивных и эмбриологических методов (искусственного осеменения, суперовуляции, пересадки зародышей и т. д.), а также от развития инновационных технологий (клонирования и другие способов репродукции).

18.8. Диагностика

Развитие биотехнологий было обусловлено и растущей озабоченностью проблемами безопасности пищевых продуктов для здоровья. Основанные на использовании биотехнологий диагностические методы позволяют быстрее принимать решения, чем более медленные и дорогие традиционные методы. Поскольку при анализе большинства образцов пищевых продуктов на наличие посторонних примесей и контами-

нантов результат чаще всего бывает отрицательным, новые диагностические тесты рекомендуется применять в ходе текущего производственного контроля, а для более подробного анализа меньшего числа «положительных» и контрольных образцов лучше использовать традиционные методы.

Ежегодно в США пищевые отравления и заболевания из-за потребления пищевых продуктов и воды, контаминированных патогенными для человека микроорганизмами, затрагивают более 80 млн человек, что обходится более чем в $40 млрд долларов. Каждый год около 9000 американцев умирают от заболеваний, вызываемых *E. coli* (из мяса) и сальмонеллами (из мяса птицы). В настоящее время практически все традиционные методы контроля являются визуальными. Быстрые и точные неинвазивные биотехнологические методы способны исправить ситуацию с обнаружением и контролем как пищевых патогенов, так и химических примесей. Для обнаружения сальмонелл, листерий, *E. coli* O157:H7 и золотистого стафилококка разработаны специальные ДНК-зонды. По сравнению с традиционными методами посева эти новые средства диагностики более точны и требуют меньше времени на проведение анализа и обучение персонала. Разработан также промышленный метод ДНК-диагностики норовирусов. Поскольку техника посева не может обеспечить надежность обнаружения этой основной причины гастроэнтеритов, разработка генетических методов обнаружения норовирусов становится еще более важной.

Помимо обнаружения пищевых контаминантов применение ДНК-зондов и других биотехнологических инструментов позволяет снизить содержание в пищевых продуктах природных токсикантов. ДНК-зонды можно использовать при исследованиях и выведении растений для последующего изолирования генов биосинтеза основных токсикантов, при изучении механизмов генетического регулирования появления токсикантов в растениях, а также для разработки линий растений с пониженным содержанием токсичных соединений.

Одной из причин опасности некоторых пищевых продуктов для здоровья являются присутствие в них микотоксинов (см. раздел 18.6). ДНК-зонды помогают обнаруживать продуцирующие микотоксины грибы, которые начинают развиваться в продуктах растительного происхождения при ненадлежащем их хранении (например, в неправильно высушенных кукурузе или арахисе). ДНК-зонды позволяют также расширить знания об источниках грибковой контаминации окружающей среды и могут использоваться в реальных условиях. В настоящее время разработку биотехнологических методов диагностики для пищевой промышленности и сельского хозяйства ведут многие фирмы. Огромные возможности для развития этой отрасли дает стремление участников рынка к получению ускоренных, экономически эффективных методов биотехнологической диагностики.

18.8.1. Биосенсоры

Биосенсорная технология основана на сочетании знаний из области биологии и микроэлектроники. Развитие биосенсорных технологий помогает совершенствовать производство пищевых продуктов, их анализ, а также обеспечить безопасность для здоровья. Биосенсоры — это устройства, принцип действия которых основан на специфичности клеток и молекул к веществам, присутствующим в чрезвычайно малых концентрациях. В биосенсорах, измеряющих концентрацию отдельных компонентов в сложных смесях, используется высокая специфичность биомолекул. В качестве системы обнаружения используют целые бактериальные клетки или определенные молекулы (например, ферментов, антител или биомиметиков). Комбинированное применение биосенсоров в посевных культурах позволяет выявлять различные токсичные вещества и контаминанты. Молекулы и клетки можно иммобилизовать на твердой поверхности и с помощью различных физических и химических методов выявлять те специфические реакции, медиаторами которых они являются (рис. 18.18) [29]. В электронных биосенсорных системах при взаимодействии объекта исследования с биологическим веществом датчик передает цифровой сигнал, пропорциональный концентрации данного вещества. Существуют биосенсоры для обнаружения сахаров, спиртов, эфиров, пептидов, аминокислот, антибиотиков, а также для определения типов клетки. Совершенствованию биосенсорных технологий и эффективному использованию биомиметических систем способствует разработка мембран с заданными свойствами, способных «сортировать» молекулы по их размерам, электрическому заряду или растворимости.

Воспроизводить все более тонкие молекулярные и клеточные процессы, выявлять и анализировать химические и микробиологические контаминанты пищевых продуктов позволяют такие технологии, как

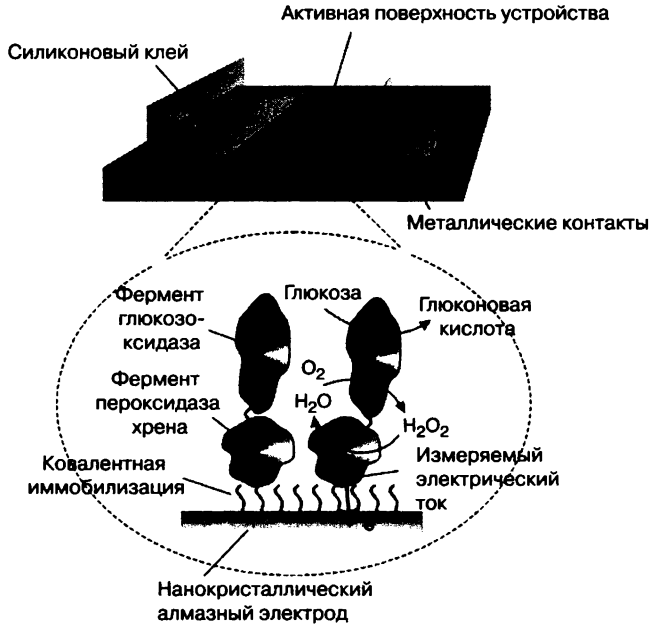


Рис. 18.18. Схема ферментативно модифицированного нанокристаллического алмазного электрода. На поверхности алмаза ковалентно иммобилизуется бислой ферментов (из глюкозоксидазы и пероксидазы хрена). Каскад электрохимических реакций, вызванных присутствием глюкозы, преобразуется в электрический ток, измеряемый на алмазном электроде. По [28]

микролитография, технология ультратонких мембран (пленок) и технология молекулярной самосборки. Достижения в области полупроводников позволяют комбинировать химические и биологические компоненты, интегрируя цепи в миниатюрные системы. Биосенсоры можно монтировать непосредственно на технологических линиях по производству пищевых продуктов и поточно отслеживать параметры в реальном времени. Миниатюрные биосенсоры можно также встраивать в упаковку пищевых продуктов — в этом случае они будут отслеживать температурную историю и степень контаминации продукта микроорганизмами с индикацией остаточного срока годности, то есть для потребителя они выполняют функцию индикатора состояния продукта в момент покупки.

Естественно, что все инновационные технологии должны быть одобрены и разрешены к использованию в пищевой промышленности соответствующими реглментирующими органами. С помощью хорошо организованного и спланированного долгосрочного молекулярно-биологического исследования можно охарактеризовать штаммы микроорганизмов и соотнести их с существующими коллекциями культур. Штаммы из коллекций микроорганизмов, присутствующих в пищевых продуктах, можно было бы использовать для микробиологического анализа, а выявленная контаминированная продукция должна стать объектом контроля и анализа в целях совершенствования контроля за выращиванием сельхозсырья, его транспортировки, переработки, сбыта и реализации.

18.9. Безопасность генно-модифицированного растительного сырья

Результаты научных исследований и имеющиеся факты свидетельствуют, что применение ГМ-технологий не связано с дополнительными рисками относительно безопасности для здоровья пищевых продуктов и кормов. Убедительных свидетельств, что официально одобренные и разрешенные к использованию ГМ-продукты могут нанести какой-либо вред здоровью человека, нет. К этому заключению пришли многочисленные национальные и международные организации, в том числе Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО), Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), Органи-

зация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), Еврокомиссия (ЕК), Французская академия наук, Национальный совет по научным исследованиям Академии наук США (*National Research Council of the National Academy of Science*), Британское Королевское общество, а также Общество по токсикологии (*Society of Toxicology*) [24].

Для генно-модифицированных сельскохозяйственных культур в отличие от культур, полученных методами традиционной селекеции, разработана и внедрена строжайшая процедура оценки их безопасности для здоровья на основе комплексного систематического подхода [16]. Этот научно обоснованный подход заключается в классической оценке токсикогенного потенциала нового признака и общего качественного состояния генно-модифицированной культуры. Кроме того, внимательно изучается история и безопасность потребления «родительской» культуры, а также донора(ов) конкретного гена. Общая оценка безопасности заключается в подтверждении «существенного соответствия» нового материала модели, принятой во всех международных документах, регулирующих исследования в области биотехнологии сельскохозяйственных культур. На основе этой модели проводится сравнение, ищется сходство и различия между генно-модифицированным продуктом и соответствующим контрольным веществом или организмом, безопасность употребления и применения которого исторически доказана. Разработка подробного профиля на каждой из стадий трансформации от родительской культуры к новой, а также тщательная оценка безопасности и всех различий, существующих между ГМ- и традиционным продуктом, — все это этапы построения универсальной информационной матрицы. Эта информация впоследствии используется при принятии решения, являются ли пищевые продукты или корма, полученные с применением ГМ-культуры, столь же безопасными для здоровья, как и аналогичные им традиционные. Отсутствие доказанного отрицательного воздействия производства и потребления ГМ-культур, полученных в последние 7 лет и возделываемых на площадях более чем в 235 млн га, свидетельствует о полной их безопасности для здоровья.

В документе, подготовленном Советом по научным исследованиим Академии наук США и посвященном проблемам использования ГМ-растений, защищенных от вредителей, научным исследованиям в этой области и ее регулированию, отмечается, что не существует особой разницы между культурами, модифицированными с помощью современных молекулярных технологий и традиционными методами селекции растений [64]. В этом документе подчеркивается, что ни у одного ученого нет никаких доказательств того, что современные ГМ-продукты небезопасны для потребления. Фактически же делается вывод, что возделывание таких культур по сравнению с другими может иметь свои экологические преимущества.

Меморандум Общества токсикологии от 2003 г. это подтверждает — в нем говорится, что нет причин предполагать, что производство пищевых продуктов, полученных с применением биотехнологий, связано с рисками иной природы, чем давно известные токсикологам риски, или с рисками, присущими традиционной практике выведения и выращивания растений и их сортов, пород животных, а также использования микроорганизмов [82]. Здесь важно понимать, что объектом для оценки безопасности является собственно пищевой продукт, а не процесс его производства.

В Докладе Еврокомиссии, в котором были обобщены итоги исследований биологической безопасности, проводившихся в течение 15 лет 400 научными коллективами различных европейских стран, также утверждается, что в ходе изучения присутствующих в настоящее время на рынке ГМ-растений и пищевых продуктов на их основе не было выявлено никаких новых рисков для здоровья человека и состояния окружающей среды за исключением традиционных проблем возделывания сельскохозяйственных культур [22]. Вполне возможно, что применение более точных методов и новой нормативной базы заставит признать ГМ-растения даже более безопасными, чем обычные растения и пищевые продукты на их основе. Исследования в области транскриптомики и метаболизма пшеницы и картофеля показали, что в рамках отдельных их сортов и между традиционно выращиваемыми их культиварами, причем в одном месте возделывания, наблюдаются существенные различия, иногда значительно большие, чем различия между геннно-модифицированным и «родительским» видом (за исключением принудительного изменения какого-либо признака) [4, 11]. Более того, различия между сайтами в рамках отдельных линий растений оказывались, как правило, большими, чем между линиями одного и того же сайта обеих групп.

Тем не менее, применения только транскриптомики может оказаться недостаточно, поскольку оценивается потенциальное влияние экспрессии гена на метаболические и фенотипические признаки, а наши

знания о биологических системах ограничены, из-за чего дать точный прогноз оказывается невозможным. Вместо попыток предсказать потенциальные побочные эффекты лучше непосредственно измерять свойства генотипа и его взаимодействия с окружающей средой.

Более эффективной системой оценки представляется метаболомика, методы которой направлены на достижение двух целей а) распознавание и классификация образцов (например, сравнительный анализ генетической модификации) и б) проведение биохимических и механистических исследований. Метаболомика помогает выявить, какие именно части крупной биохимической системы реагируют на генетическую модификацию. Таким образом, непредвзятая и всесторонняя оценка непосредственных и потенциальных рисков должна сосредоточиться прежде всего на анализе белков и их метаболитов с разработкой методов валидизации и статистического анализа при скрупулезном ведении соответствующих баз данных. Если метод фингерпринтинга позволяет выявить различия в составе ГМ-сырья, то при сравнительной оценке следует опираться на верифицированные количественные методы сравнительного анализа и данные фингерпринтинга — именно на этой основе формируется более полное понимание результатов фингерпринтинга и принимается решение, проводить ли дальнейшие исследования безопасности ГМ-продуктов.

Ниже мы приводим основные принципы достигнутого международного консенсуса [15], позволяющие понять основные направления непрекращающихся научных споров.

Существенное соответствие (основополагающий принцип оценки безопасности). «Существенное соответствие» определяется в процессе сравнения ГМ-продукта с его традиционным безопасным аналогом путем сопоставления агрономических характеристик, фенотипа, экспрессии трансгенов, состава макро- и микронутриентов, а также путем выявления сходств и различий между генномодифицированным и обычным продуктом. При этом анализируются все белки, продуцируемые внедренной ДНК.

Потенциальный перенос гена. В некоторых случаях бывает необходимо оценить, не вызывается ли получаемое преимущество признаком, нежелательным с точки зрения безопасности для здоровья. В качестве примера можно привести почти невероятное предположение, что ген, кодирующий лекарственные свойства какого-либо растения, можно перенести в кукурузу. В тех случаях, когда внедряемый(е) ген(ы) может быть перенесен из одной культуры в другие, необходимо проанализировать потенциальное воздействие этого на окружающую среду.

Потенциальная аллергенность. Поскольку основными пищевыми аллергенами являются белки, необходимо учитывать потенциальную аллергенность вновь экспрессируемых белков в составе пищевых продуктов. В настоящее время используется метод принятия решений, предложенный в 1996 г. *ILSI/IFBC* (*International Life Sciences Institute/International Food Biotechnology Council*) и обновленный в Кодексе Алиментариус ФАО/ВОЗ (2003 г.). Отправной точкой для применения этого метода должно быть знание аллергенных свойств организма-донора генов. Затем рассматриваются вопросы структурного сходства между внедренным и аллергенными белками, усвояемость внедренного белка(ов), в при необходимости проводят серологические тесты на перенесенный белок или/и генномодифицированный продукт.

Потенциальная токсичность. Известно, что некоторые белки токсичны (например, энтеротоксины патогенных бактерий или растительные лектины). Наиболее распространенными тестами на токсичность являются биоинформационное сравнение аминокислотных последовательностей вновь экспрессированного(ых) белка(ов) с аминокислотными последовательностями, характерными для известных токсинов, а также эксперименты на токсичность, проводимые на грызунах, которым вводятся конкретные белки. Помимо чистых белков в экспериментах на животных проверяют цельное зерно ГМ-культур (как правило, в ходе трехмесячных исследований на грызунах).

Непредвиденные последствия. Помимо желаемых последствий генетической модификации, взаимодействие внедренной последовательности ДНК с геномом растения может привести к непредвиденным явлениям. Еще одной причиной непредвиденных последствий может оказаться неожиданное изменение метаболизма растения в результате изменения какого-либо признака (такие явления могут быть как предусмотренными, так и непредвиденными). Например, изменения метаболитов

и конечных точек метаболического пути, являвшиеся целью модификации, будут нежелательными, но предсказуемыми, а «переключение» на неизвестные эндогенных гены в результате случайного их внедрения в контрольную область будет как непреднамеренным, так и непредвиденным. Процесс разработки промышленного пищевого продукта на основе выбора одного варианта из сотен и тысяч первоначальных трансформаций сводится к исключению абсолютного большинства ситуаций, которые могут привести к непредвиденным изменениям. Чтобы исключить эти эффекты с еще большей вероятностью, отобранный «кандидат на промышленный продукт» подвергается затем тщательному фенотипическому, агрономическому, морфологическому и композиционному анализу.

Долгосрочные последствия. Общепризнано, что необходимо проводить очень тщательную оценку безопасности пищевых продуктов для здоровья еще до их запуска в производство и выведения на рынок, исключив потенциальные негативные последствия употребления пищевых продуктов или кормов на основе ГМ-культур. Вместе с тем некоторые ученые настаивают, что такие продукты должны отслеживаться на предмет долгосрочных последствий для здоровья и после их выведения на рынок. Вопрос, насколько подобный контроль технически возможен, для мирового сообщества по-прежнему остается дискуссионным, поскольку для анализа нет никаких гипотез, а подлежащая такому анализу ГМ-культура, скорее всего, не пройдет даже проверок на соответствие действующим нормативным актам. Для этого предлагается использовать биомаркеры, но в таком случае пришлось бы тестировать все виды пищевых продуктов и кормов независимо от их происхождения, что с экономической точки зрения практически не осуществимо.

18.9.1. Этикетирование и маркировка

В последнее время активно дискутируется вопрос, следует ли специальным образом маркировать продукты, полученные с применением ГМО. Согласно требованиям *FDA* к маркировке пищевых продуктов [25], в том числе генно-модифицированных и других продуктов, полученным с помощью инновационных технологий, маркировка должна быть точной и «адекватной». Существуют лишь две ситуации, когда *FDA* требует указания на этикетке сведений о трансгенном происхождении продукта или его ингредиента:

в случае наличия фактов о возможных существенных последствиях потребления данного продукта (например, «перед употреблением фасоль следует замочить и отварить»);

в случае наличия фактов, дополняющих другие приводимые на этикетке сведения.

Соответственно, особая маркировка необходима, «если продукт получен на основе новой разновидности растения, отличной от традиционной, и к нему не может быть применено общеупотребительное или обычное название, или если существует определенный риск или связанная с его употреблением особенность, о которых потребители должны быть предупреждены». В программном документе [25] утверждается, что перед коммерциализацией продукта (его выведением на рынок) не требуется никаких предварительных разрешений за исключением тех случаев, когда характеристики продукта, полученного с помощью биотехнологий, вызывают очевидные опасения с точки зрения их безопасности для здоровья потребителей. Таким образом, *FDA* не имеет права требовать использования какой-либо особой маркировки, поскольку генетический метод, используемый для разработки новых разновидностей растительного сырья, не отвечает ни одному из двух критериев «адекватности». Очевидно, что большинство новых продуктов с повышенной пищевой ценностью следует маркировать соответствующим образом, поскольку они отличаются от своих традиционных аналогов. В большинстве случаев фирмы, продвигающие такие продукты, желают подчеркнуть именно их повышенную нутритивную ценность.

18.9.2. Генно-модифицированное лекарственное сырье

Несмотря на то что вопросы использования растительного сырья в производстве фармацевтических и лекарственных средств (*PMP* и *PMIP*, соответственно *Plant-Made Pharmaceuticals и Plant-Made Industrial Products*) выходят за рамки данной главы, проблемы регламентирования в этой области очень важны для обеспечения целостности подхода к реализации пищевых продуктов и кормов. Среди растений, которые могут быть использованы для производства лекарственных средств на основе растительного сырья,

можно назвать люцерну, канолу, кукурузу, картофель, рис, сафлору, сою и табак. Эти пищевые и непищевые культуры для фармацевтических целей перерабатывают иначе, чем генно-модифицированные растения, предназначенные для пищевых производств. Растительное сырье, используемое для производства лекарственных средств, хорошо изучено с точки зрения опыления растений, генетики, поведения семян в состоянии покоя и их способности противостоять сорнякам. Эта информация помогает решать проблемы переноса пыльцы и, соответственно, потока генов между традиционно выращиваемыми культурами и генно-модифицированными растениями. Довольно длительный опыт возделывания «кандидатов на лекарственное сырье» свидетельствует, что такие растения практически не способны «захватывать» естественные экосистемы, то есть при возделывании таких растений их следует просто максимально изолировать от культур, предназначенных для производства пищевых продуктов.

Нормативно-правовая основа существует уже более десяти лет, и по мере накопления опыта разведения генно-модифицированных растений она продолжает совершенствоваться. В управлении рисками следует обязательно учитывать вопрос безопасности этих культур для здоровья человека (как работников сельского хозяйства, так и конечных потребителей) и экосистем. Основное внимание уделяют потоку генов и их смешению. Существует несколько способов сравнительно эффективного контроля потоков генов. Некоторые способы снижения риска оттока генов из трансгенных культур (например, использование мужских стерильных растений) приносят хороший результат, но количество видов растений, к которым их можно применить, ограничено. Для многих культур, у которых хлоропласты наследуются строго по материнской линии, то есть не передаются с пыльцой, эффективным способом «принятия» чуждых генов является трансформация генома хлоропласта. В последние годы получены патенты на способы привязки «суицидных» генов к «ДНК-переключателям», которые можно было бы «запереть» внутри клеток пыльцы, тем самым блокировав их развитие, а также на способы использования генов, убивающих гибридные семена при начале их прорастания. Подобные генетические технологии рестрикции (*GURT, Genetic Use Restriction Technologies;* их еще называют «терминаторными технологиями») позволяют сделать урожайность культуры признаком, который с помощью иРНК можно «включить» или «выключить».

По данным проведенных экспериментов даже в случае перекрестного опыления кукурузы вероятность обнаружения одного трансгенного зерна в тысяче зерен маловероятна. Из этого можно сделать вывод, что соответствующие ограничительные меры относительно непреднамеренного взаимодействия с потоком генов становятся почти невозможными. Риск нежелательного воздействия на человека так же мал, как и при попадании в пищу активного лекарственного ингредиента (*API, active pharmaceutical ingredient*).

Мы изложили реальное положение дел, но любые измышления относительно растительного сырья и даже сознательная его фальсификация, причем при крайне малом риске или вообще его отсутствии, может погубить становление этой многообещающей области знаний.

18.10. Краткое резюме

Правильное сочетание тестирования ГМ-продуктов относительно их безопасности для здоровья и окружающей среды с государственным регулированием и регламентированием является предметом непрекращающихся дискуссий. Их целью должно стать совершенствование, а не торможение исследований в области биотехнологий. Режим контроля и регулирования должен обеспечивать условия, при которых пищевые продукты независмо от способа их получения будут подвергаться одинаково строгим проверкам как с точки зрения их воздействия на окружающую среду, так и безопасности для здоровья потребителей. ГМ-продукты уже потребляются миллионами людей, и до сих пор не было выявлено никаких негативных последствий, которые можно было отнести непосредственно на счет ГМ-технологий. И современная наука, и длительный практический опыт свидетельствуют, что оценивать риски и пользу следует по собственно продукту, а не по способу его получения. Ученые уверены, что если мы откажемся от научных методов оценки безопасности пищевых продуктов и их влияния на окружающую среду, то тем самым замедлим темпы развития общества или вообще лишимся преимуществ, которые позволили резко сократить использование ядохимикатов в растениеводстве. Кроме того, тем самым мы ограничим возможности улучшения питания населения и качества пищевых продуктов, то есть затормозим развитие сельского хозяйства США и других стран.

Литература

1. Austin-Phillips S., Bingham E. T., Koegel R. G., Rausch J., Straub R. J., Will J., Zeigelhoffer T., Zeigellhoffer P., Burgess R. R. Production of industrial and animal feed enzymes in transgenic alfalfa. — 1999. (http://www.molecularfarming.com/nonmedical.html), accessed July 24, 2003.
2. Baba N., Bracco E. F., Hashim S. A. Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982, 35, p. 678–682.
3. Bacon J. R., Williamson G., Garner R. C., Lappin G., Langouet S., Bao Y. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes // *Carcinogenesis*, 2003, 24, p. 1903–1911.
4. Baker J. M., Hawkins N. D., Ward J. L., Lovegrove A., Napier J. A., Shewry P. R., Beale M. H. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat // *Plant Biotechnol. J.*, 2006, 4, p. 381–392.
5. Beauregard M., Dupont C., Hefford M. A. Design, expression and initial characterization of MB1, a de novo protein enriched in essential amino acids // *Biotechnology*, 1995, 13, p. 974–981.
6. Block G., Patterson B., Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence // *Nutr. Cancer*, 1992, 18, p. 1–29.
7. Brinch-Pedersen H., Galili G., Knudsen S., Holm P. B. Lysine modification in *Zea Mays* // *Plant Mol. Biol.*, 1996, 32, p. 611–620.
8. Brock R. D. Prospects and perspectives in mutation breeding // *Basic Life Sci.*, 1976, 8, p. 117–132.
9. Buchanan B. B., Adamidi C., Lozano R. M., Yee B. C., Momma M., Kobrehel K., Ermel R., Frick O. L. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, 94, p. 5372–5377.
10. Catchpole G. S., Beckmann M., Enot D. P. et al. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, 102, p. 14458–14462.
11. Cech T. R. The Ribosome is a Ribozyme // *Science*, 2000, 289, p. 878–879.
12. Chakraborty S., Chakraborty N., Datta A. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, 97, p. 3724–3729.
13. Chaplin M., Bucke C. *Enzyme Technology.* — Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
14. Chassy B., Hlywka J. J., Kleter G. A., Kok E. J., Kuiper H. A., Newell-McGloughlin M., Munro I. C., Phipps R. H. Safety and Nutritional Assessments of Foods and Feeds Derived Through Biotechnology: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. —2004. — Vol. 3, Issue 2. — Washington, DC: International Life Sciences Institute; Institute of Food Technologists, 2004.
15. Cockburn A. Assuring the safety of GM food // *J. Biotechnol.*, 2002, 98, p. 79–106.
16. Dehesh K., Jones A., Knutzon D. S., Voelker T. A. Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana* // *Plant J.* 1996, 9, p. 167–172.
17. DellaPenna D. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health // *Science*, 1999, 285, p. 375–379.
18. Del Vecchio A. J. High laurate canola. How Calgene's program began, where it's headed // *INFORM Int. News Fats, Oils Relat. Mat.*, 1996, 7, p. 230.
19. Devlin R. H., Biagi C. A. Yesaki T. Y. Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains // *Aquaculture*, 2004, 236, p. 607–632.
20. Dykxhoorn D. M., Novina C. D., Sharp P. A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression // *Nat. Revs. Mol. Cell. Biol.*, 2003, 4, p. 457–467.
21. EC-Sponsored Research into on Safety of Genetically Modified Organisms; Fifth Framework Programme — External Advisory Groups. «GMO research in perspective». Report of a Workshop Held by External Advisory Groups of the «Quality of Life and Management of Living Resources» Programme. — 2001. — http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/gmo/index.html); http://europa.eu.int/comm/research/fp5/eag-gmo.html. Accessed July 22, 2003.
22. Falco S., Guida T., Locke M., Mauvais J., Saunders C., Ward T., Weber P. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine // *Bio/Technology*, 1995, 13, p. 577–582.
23. Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plant Origin: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology, May 29–June 2, 2000. — Rome, Italy: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO/WHO), 2000. — ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/gmreport.pdf (acessed July 22, 2003).
24. Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties / FDA // Federal Register, 1992, Vol. 57, № 104. — http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biotechm.html (acessed July 22, 2003).
25. Friedman M., Rayburn J. R., Bantle J. A. Developmental toxicology of potato alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay —Xenopus (FETAX) // *Food Chem. Toxicol.*, 1991, 29, p. 537–547.
26. Friedrich L., Vernooij B., Gaffney T., Morse A., Ryals J. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene // *Plant Mol. Biol.*, 1995, 29, p. 959–968.
27. Fushiki T., Matsumoto K., Inoue K., Kawada T., Sugimoto E. Swimming endurance capacity of mice is increased by chronic consumption of medium-chain triglycerides // *J. Nutr.*, 1995, 125, p. 531–539.
28. Garrido J. A. *Biosensing with Diamond-Based Devices.* — Walter Schottky Institute, 2006. — http://www.wsi.tumuenchen.de/E25/research/DiamondGarrido/josegarrido/Diamond.htm (accessed September 25, 2006).

29. Geliebter A., Torbay N., Bracco E. F., Hashim S. A., Van Itallie T. B. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat // *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, 37, p. 1–4.
30. Gerhauser C., You M., Liu J. F., Moriarty R. M., Hawthorne M., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drag-metabolizing enzymes // *Cancer Res.*, 1997, 57, p. 272–278.
31. Gianessi L. P., Silvers C. S., Sankula S., Carpenter J. E. Executive Summary: Plant Biotechnology — Current and Potential Impact for Improving Pest Management in US Agriculture. An Analysis of 40 Case Studies / NCFAP (National Center for Food and Agricultural Policy). — Washington, DC, 2002. — P. 1–23. — http://www.ncfap.org/40CaseStudies.htm (accessed July 22, 2003).
32. Giovannucci E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer // *Exp. Biol. Med.*, 2002, 227, p. 852–859.
33. Goldberg I. *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals.* — New York, NY: Chapman & Hall, 1994.
34. Goto F., Yoshihara T., Shigemoto N., Toki S., Takaiwa F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene // *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, p. 282–286.
35. Griga M., Kosturkova G., Kuchuk N., Ilieva-Stoilova M. Biotechnology // *Carbohydrates in Grain Legume Seeds. Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics* / C. L. Hedley (ed.). — Wallingford, UK: CAB International, 2001. — P. 145–207.
36. Hall A. H., Rumack B. H. Clinical toxicology of cyanide // *Ann. Emerg. Med.*, 1986, 15, p. 1067–1074.
37. Hannon G. J. RNA interference // *Nature*, 2002, 418, p. 244–251.
38. Hartwig E. E., Kuo T. M., Kenty M. M. Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybeans // *Crop Sci.*, 1997, 37, p. 770–773.
39. Helm R. M., Cockrell G., Connaughton C., West C. M., Herman E., Sampson H. A., Bannon G. A., Burks A. W. Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30K // *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 105, p. 378–384.
40. Herman E. M., Helm R. M., Jung R., Kinney A. J. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean // *Plant Physiol.*, 2003, 132, p. 36–43.
41. Herrera-Estrella L., Depicker A., van Montagu M., Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector // *Nature*, 1983, 303, p. 209–213.
42. Hipskind J. D., Paiva N. L. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis* // *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2000, 13, p. 551–562.
43. James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops // ISAAA Brief № 35. — Ithaca, NY: ISAAA, 2006. — http://www.isaaa.org/ (accessed February 17, 2007).
44. James M. J., Ursin V., Cleland L. G. Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids // *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 77, p. 1140–1145.
45. Jang M., Cai L., Udeani G. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes // *Science*, 1997, 275, p. 218–220.
46. Johnson I. T. Glucosinolates: bioavailability and importance to health // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2002, 72, p. 26–31 (Review).
47. Jorgensen R., Cluster P., Que Q., English J., Napoli C. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single copy vs.complex T-DNA sequences // *Plant Mol. Biol.*, 1996, 31, p. 957–973.
48. Kang J. X., Wang J. Wu L., Kang Z. B. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids // *Nature*, 2004, 427, p. 504.
49. Kerr P. S., Pearlstein R. W., Schweiger B. J., Becker-Manley M. F., Pierce J. W. Nucleotide sequences of galactinol synthase from zucchini and soybean. — U.S. Patent Application № 5773699, June 30, 1998.
50. Keshavarz K. The effect of different levels of nonphytate phosphorus with and without phytase on the performance of four strains of laying hens // *Poult. Sci.*, 2003, 82, p. 71–91.
51. Kinney A. J., Knowlton S. Designer oils: the high oleic acid soybean // *Genetic Modification in the Food Industry* / S. Rollerand, S. Harlander (eds). — London, UK: Blackie, 1998. — P. 193–213.
52. Lucca P., Hurrell R., Potrykus I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice // *J. Am. Coll. Nutr.*, 2002, p. 21, p. 184S–190S.
53. Maga E. A., Walker R. L., Anderson G. B., Murray J. D. Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora // *Transgenic Res.*, 2006, 15, p. 515–519.
54. Mandal M., Boese B., Barrick J. E., Winkler W. C., Breaker R. R. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria // *Cell*, 2003, 113, p. 577–586.
55. McCue K. R., Shepherd L. V. T., Allen P. V., Maccree M. M., Rockhold D. R., Davies H. V., Belknap W. R. Modification of steroidal alkaloid biosynthesis in transgenic tubers containing an antisense *sterol glyco transferase* (Sgt) gene encoding a novel steroidal alkaloid diglycoside rhamnosyl transferase: paper presented at the 87th Annual Meeting of The Potato Association of America, August 10–14, 2003. — Spokane, WA, 2003.
56. Mehta R. A., Cassol T., Li N., Ali N., Handa A. K., Mattoo A. K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life // *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, p. 613–618.
57. Munkvold G. P., Hellmich R. L., Rice L. G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids // *Plant Dis.*, 1999, 83, p. 130–138.
58. The National Centre for Biotechnology Education (NCBE), 2006. —http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/NCBE/menu.html (accessed September 25, 2006).

59. Ness J. E., Welch M., Giver L., Bueno M., Cherry J. R., Borchert T. V., Stemmer W. P., Minshull J. DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin // *Nat. Biotechnol.,* 1999, 17, p. 893–896.
60. Newell-McGloughlin M., Burke J. *Biotechnology: Present Position and Future Potential.* — Dublin, Ireland: Publishers, Teagasc, 2000.
61. Genetically modified organisms in animal production / North Carolina Cooperative Extension Service // *Swine News* (Raleigh, NC), 2000, 23(5).
62. Report on «Genetically Modified Pest-Protected Plants: Science and Regulation» / NRC, National Academy of Sciences. — Washington, DC, 2000. — http://www.nap.edu/catalog/9795.html (accessed July 22, 2003).
63. O'Quinn P., Nelssen J., Goodband R., Knabe D., Woodworm J., Tokach M., Lohrmann T. Nutritional value of a genetically improved high-lysine, high-oil corn for young pigs // *J. Anim. Sci.,* 2000, 78, p. 2144–2149.
64. Pinkert C. A., Murray J. D. Transgenic farm animals // *Transgenic Animals in Agriculture* / J. D. Murray, G. B. Anderson, A. M. Oberbauer, M. M. McGloughlin (eds). — London: CABI, 1999. — P. 1–18.
65. Plasterk R. H. RNA silencing: the genome's immune system // *Science,* 2002, 296, p. 1263–1265.
66. Potrykus I. Vitamin-A and iron-enriched rices may hold key to combating blindness and malnutrition: a biotechnology advance // *Nat. Biotechnol.,* 1999, 17, p. 37.
67. Prakash C. S., Egnin M., Jaynes J. Increasing the protein content in sweet potato using a synthetic storage protein gene // *Am. Chem. Soc.,* 2000, 219, AGFD69 (Abstracts).
68. Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr. Status of research with transgenic farm animals // *J. Anim. Sci.,* 1993, 71 (Suppl. 3), p. 10–19.
69. Rapp W. Development of soybeans with improved amino acid composition // 93rd AOCS Annual Meeting & Expo, May 5–8, 2002. — Montreal, Quebec, Canada, 2002.
70. Rickard S. E., Thompson L. U. Phytoestrogens and lignans: effects on reproduction and chronic diseases // *Antinutrients and Phytochemicals in Food* / R. Shahidi (ed.). — Washington, DC: American Chemical Society, 1997. — P. 273–293.
71. Richardson P. H., Jeffcoat R., Shi Y.-C. High-Amylose Starches: From Biosynthesis to Their Use as Food // MRS (Material Research Society) Bulletin, December 2000. — Warrendale, PA, 2000. — P. 20–24. — http://www.mrs.org/membership/preview/dec2000bull/Richardson.pdf (accessed October 17, 2003).
72. Risley C. R., Lohrmann T. T. Growth performance and apparent digestibility of weanling pigs fed diets containing low stachyose soybean meal // *J. Anim. Sci.,* 1998, 76 (Suppl. 1), p. 179 (Abstract).
73. Sanford J. C., DeVit M. J., Russell J. A., Smith F. D., Harpending P. R., Roy M. K., Johnston S. A. An improved, helium-driven biolistic device // *Technique,* 1991, 3, p. 3–16.
74. Schwall G. P., Safford R. Westcott R. J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y. C., Gidley M. J., Jobling S. A. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B // *Nat. Biotechnol.,* 2000, 18, p. 551–554.
75. Sevenier R., Hall R. D., van der Meer I. M., Hakkert H. J. C., van Tunen A. J., Koops A. J. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet // *Nat. Biotechnol.,* 1998, 16, p. 843–846.
76. Simmonds D. H., Donaldson P. A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes // *Plant Cell Rep.,* 2000, 19, p. 485–490.
77. Siritunga D., Sayre R. T. Generation of cyanogen-free transgenic cassava // *Planta,* 2003, 217, p. 367–373.
78. Sokol D. L., Murray J. D. Antisense and ribozyme constructs in transgenic animals // *Trans Res.,* 1996, 5, p. 363–371.
79. The safety of genetically modified foods produced through biotechnology: Report of the society of toxicology (SOT) // *Toxicol. Sci.,* 2003, 71, p. 2–8.
80. Stark D. M., Timmerman K. P., Barry G. F., Preiss J., Kishore G. M. Role of the amount of starch in plant tissue by ADP glucose pyrophosphorylase // *Science,* 1992, 258, p. 287–292.
81. Steinmetz K. A., Potter J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review // *J. Am. Diet. Assoc.,* 1996, 96, p. 1027–1039.
82. Suarez F. L., Springfield J., Furne J. K., Lohrmann T. T., Kerr P. S., Levitt M. D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides // *Am. J. Clin. Nutr.,* 1999, 69, p. 135–139.
83. Taylor S. L., Hefle S. L. Allergic reactions and food intolerances // *Nutritional Toxicology* / F. N. Kotsonis, M. Mackey (eds). —2nd ed. — NY: Taylor & Francis, 2001.
84. Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. Embryonic stem cell lines derived from human // *Blastocysts,* 1998, 282, p. 1145–1147.
85. Ursin V. Genetic modification of oils for improved health benefits: presentation at conference «Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Health: Dietary Recommendations for Fatty Acids: Is There Ample Evidence?», June 5–6, 2000. — Reston, VA: American Heart Association, 1998.
86. Watkins S. M., Carter L. C., Mak J., Tsau J., Yamamoto S., German J. B. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells // *J. Dairy Res.,* 1999, 66, p. 559–567.
87. Wehrspann J. New traits of seed buying // *Farm Industry News,* 1998, 31.
88. Yuan L., Knauf V. C. Modification of plant components // *Curr. Opin. Biotechnol.,* 1997, 8, p. 227–233.
89. Ye X., Al-Babili S., Kloti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm // *Science,* 2000, 287, p. 303–305.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

A
Абсцизовая кислота 913
Авидин 243
Агар 143
Агликон 554
Активность воды 22, 50–55, 377–378
Акриламид 102–104
  образование 102–103, 715
  содержание в пищевых продуктах 103–104
Актин 858, 866–867
α-Актинин 869
β-Актинин 869
Аланин 214
Алитам 657, 659
Алифатические кислоты 936
Алкалаза 279
Алкилфенолы 618–619
Алкилпиразин 623
Алкогольдегидроненаза 243, 608
Алкоксильный радикал 190
Аллергены 1009
Аллиназы 400–402
  чеснока 324
Аллицин 702
Альбумин сывороточный 818
Альгинатные гели 144
Альгиновая кислота 143–144
Альгины 109, 116, 143–145
  альгинат натрия 117, 143
Альдегиды, ароматические ноты 297
Альдозы 88–89
Альдоновые кислоты 94
Алюминий 519
Амадори перегруппировка 98
  продукты 98–99, 791, 794
Амигдолин 713
α-Амилаза 130, 343–345, 347
β-Амилаза 130, 345
Амилоза 115
Амилопектин 115, 122
Аминокислотные остатки 252
Аминокислоты 214–224
  алифатические 214
  амидные 215
  ароматические 214
  гидроксиамиеркислоты 215
  гидрофобность 218–221
  кислые 215
  оптические свойства 221
  основные 214
  производные 215
  растворимость в воде 218
  реакционная способность 221–224
  свойства ионизируемых групп 217
  серосодержашие 215
  стереохимия 216
  структура и классификация 214
  физико-химические свойства 219
  эссенциальные 282–284
Аминоредуктоны 795
Аммония бикарбонат 635
АМФ 595
Амфолиты 216
Анис 614
Аномеры 92
Антибиотики 656
Антинутриенты 1008–1009
Антиоксиданты 193–200, 644–646
  взаимодействия 199–200
  локализация 200
Антислеживатели 678
Антоцианидины 555–556
Антоцианы 531, 554–563, 804–805
  ацилированные 562
  преобразования 556–558
  сопигментация 561–562
  стабильность 556
  структура 554–556
  ферментативные реакции 562–563
Апоптоз 693
Апоферритин 503
L-Арабиноза 92–93

Арахидоновая кислота 619
Аргинин 100, 214
Ароматические единицы 590
Ароматические соединения, биогенез и распад 950–951
Аррениуса уравнение 20, 64
Аскорбиновая кислота 197, 424, 439–446, 559
  механизмы разрушения 441–443
  продукты разложения 444
Аспарагин 215
Аспарагиновая кислота
Аспартам 657, 659
  реакции расщепления 660
  синтез 363
АТФ-синтез 864
Ауксины 913
Ауроны 555
Ацесульфам К 657, 659
Ацетальдегид 614–615
Ацеталя образование 91
Ацетоин 615
Ацилглицерины 158–161

Б
БАВ *см.* Биоактивные вещества
БАД растительного происхождения 706–708
Базилик 613
Безопасность для здоровья 18
Белки 211–307
  алкилирование 303–304
  аминокислотный состав 819
  ацилирование 304
  биологическая ценность 283–285
  биологические функции 213
  Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия 232
  водородные связи 232
  вторичная структура 226–229
  вязкость 270–272
  гелеобразование 272–275
  генная инженерия 981–982
  гидратация 251–254
  гидрофобность средняя 243
  гидрофобные взаимодействия 235–237
  глобулярные 213, 229
  денатурация 238–249, 807
  дисульфидные связи 237
  значение pH 255–256
  изменчивость 237–238, 287–302
  источники 213
  классификация 213
  конформационная стабильность 237–238, 282
  коэффициент эффективности белка 285
  коэффициент чистой утилизации белка 285
  кэпирующий 869
  миофибриллярные 857, 889
  модифицированный 100
  молочные 817–819, 824–829
  мышечные 857–871
  нутритивные свойства 281–287
  пенообразующие свойства 264–268
  пептидные связи 225
  пептидный каркас 225
  первичная структура 224–226
  пластеиновая реакция 306–307
  поверхностно-активные свойства 257–260
  перекрестная сшивка 290, 307
  растворимость 254–257
  рацемизация 289
  реакции в пищевых продуктах 784
  реакции с галогенированными растворителями 300
  реакции с липидами 299–300
  реакции с нитритами 300–301
  реакции с полифенолами 300
  реакции с сульфитами 301
  регуляторные 867–868
  саркоплазматические 857–858, 863–865
  саркоплазматического ретикулума 870–871
  свойства молекул 835
  связывание вкусоароматических веществ 268–270
  синтез 213
  сократительные 865–867
  соевые 276
  сопряженные (конъюгированные) 213
  стабильность структуры 232–237
  стерические взаимодействия 233
  структурная иерархия 224
  структурные 868–870
  сульфитолизис 305–306
  сывороточные 817, 826–829, 834, 837–838
  текстуризация 275–276
  температура денатурации 241–245
  третичная структура 229–231
  ферментативный гидролиз 306

фибриллярные 213
фолдинг 230–231
фосфорилирование 304–305
функциональные свойства 249–279, 301–302, 835–836
химические модификации 302–306
четвертичная структура 231–232
уровни гидратации 74–75
усвояемость 282–283
электростатические взаимодействия 234–235
эмульгирующие свойства 260–264
этерификация 306
Белковые гидролизаты 279–281, 360–361
аллергенные свойства 281
горечь 281
функциональные свойства 279–280
Бенедикта реактив 95
Бензоила пероксид 676
Бензойная кислота 653–654
Бетаин 476
Беталаины 531, 566–570
структура 566–567
физические свойства 567–568
химические свойства 568–570
Бетаксантин 570
Беталамовая кислота 568
Бетанин 531, 568–569, 932
Биксин 549
Биоактивные вещества 692–715
Биодоступность 709–710
семейства луковых 702–703
Биоинформатика 983
Биоразлагаемые пленки 808–809
Биосенсоры 1015–1016
Биотехнологии 970–1020
антисмысловая 977
в животноводстве 1010–1014
в растениеводстве 980–998
в рыбоводстве 1013–1014
микроматрицы ДНК 975–977
полимеразная цепная реакция 974–975
технология рекомбинантных ДНК 974
Бислои электрические 737–738
Бланширование 424
Браззеин 663
Бренстеда теория кислот и оснований 487–488
Бром 519
Бромфенолы 621
Брунауэра–Эмметта–Теллера модель 73
Бутилированный гидроксианизол 195, 645
Буферные системы 639–642
Бычий гормон роста 227
Бычий сывороточный альбумин 70, 243
Бэнкрофта правило 761

В

Валин 214
Ван-дер-Ваальсовы силы 737
Ваниль 614
Вант-Гоффа уровнение 241
Взбитость 264
Вильямса–Ланделла–Ферри уравнение 55, 60–61, 64
Витамины 415–479, 940–941
биотин 470–472
вариабельность содержания 422
витамин A 427–433
витамин B_2 см. Витамины, рибофлавин
витамин B_6 456–462
витамин B_{12} 473–475
витамин C *см.* Аскорбиновая кислота
витамин D 433
витамин E 433–438
витамин K 438–439
водорастворимые 439–475
жирорастворимые 427–438
источники 416–417
молока 842
ниацин 454–456
пантотеновая кислота 472–473
потери 424–425
рибофлавин 451–454
стабильность 415–416, 419
тиамин 447–451
токсичность 416
усвояемость 421
фолат 462–470
Вкусоароматические вещества 587–627
анализ 589
взаимодействия 806
горькие 593–598
жгучие 602–603
жиров и масел 615–617
кислые 599–
механизмы восприятия 591–592
молочнокислого брожения 614–615

мяса и молока 617–620, 623
освежающего действия 603–604
плодов, овощей и специй 604–614
рыбы и морепродуктов 620–621
серосодержащие 604–606
сладкие 592–593
спиртового брожения 614–615
со вкусом кокуми 600–601
со вкусом умами 599–600
соленые 598–599
трав и специй 612–614
усилители вкуса 600–601
цитрусовых 611–612
чая 626
чеснока 605
ВЛФ-уравнение *см.* Вильямса–Ланделла–Ферри уравнение
Вода и лед 29–83
ассоциация молекул 32–34
в белковых структурах 797
взаимодействия с растворенным веществом 42–50
влагосвязывающая способность 42, 253
влагоудерживающая способность 42, 253–254
вода жидкая, структура 37–38
водородное связывание 46
водородные связи 33
гидратация 42, 47
гидрофобные взаимодействия 50
диаграмма состояний 57–63
дипольный момент 32
диссоциация молекул 34
диэлектрическая проницаемость 33–34
ионные взаимодействия 44–45
клатратные гидраты 47–49
лед, структура 34–37, 798
молекула, строение 30–32
модели молекулярной динамики 37–38
орбитали 33
связанная вода 43–44
теплопроводность 30
фазовые соотношения 39–41
физические свойства 30–31
электростатические силы 32
Воски 162–163
ВФС *см.* Высокофруктозный сироп
Высокофруктозный сироп 90

Г
Галактоза 67, 93
β-Галактозидаза 344, 351–352
Галактоманнан 138
Гвоздика 614
ГДЛ *см.* Глюконо-дельта-лактон
Гексозы 93
Гели 113–114, 744–758
белковые 273–274
из глобулярных белков 755
из частиц 745, 748–750
казеиновые 754–755
модуль 747–748
набухание 751
пищевые 752–756
полимерные 745, 748
поперечные сшивки 808
прочность по Блуму 280
реологические характеристики 746–747
синерезис 751
слабые 751
смешанные 756
структура 745
фрактальные агрегаты 749
функциональные свойства 750–752
Геллан 118, 146
Гем 502
Гемицеллюлоза 927, 930
Гемовые соединения 530–536
структура 531
Гемоглобин 231, 243
Гендерсона–Хассельбаха уравнение 217
Генистеин 699
Генно-модифицированные организмы 972, 984
Геномика 982
Гетеропротеины 213
Гиббереллины 913
Гидрогенизация 95
Гидроколлоиды 110, 668
Гидроксиметилфурфурол 98
Гидроксипропилметилцеллюлоза 120, 137
Гидокситолуол 195–196
Гидроксония ион 33
Гидролиз крахмала, продукты 70
Гидропероксидлиаза 396–398
Гидрофильно-липофильный баланс 729
Гингеролы 602–603, 701

Гистидин 214, 388
ГЛБ *см.* Гидрофильно-липофильный баланс
Гликаны 108
Гликозидазы 336–337, 356
механизмы реакций 342
каталитические свойства 344
Гликозиды 93–94
Гликозилгидролазы *см.* Гликозидазы
Глицериловые эфиры 652
Глицерин 67, 664
Глицин 214
Глицинин соевый 243
Глицирризин 657, 662–663
Глобулин овса 243
Глутамин 215
Глутаминовая кислота 215
Глутатион 197
Глутатионпероксидаза 199
β-Глюкан 929
Глюкоамилаза 130, 344, 346–347
Глюкоза 67, 93, 593
D-глюкоза 88, 99
L-глюкоза 89
окисление 350
β-Глюкозидаза 344
Глюкозоизомераза 325
Глюконовая кислота 633
Глюконо-дельта-лактон 95
Глюкопиранозное кольцо 91–92
Глютен 277–278
аминокислотный состав 277
Глютенины 278
ГМО *см.* Генно-модифицированные организмы
ГМФ *см.* Гидроксиметилфурфурол
Гольджи аппарат 816
Гомопротеины 213
Горчица 614
Гуаровая камедь 118
Гуммиарабик 118, 147–148
Гумулон 595

Д
Дегидратация 381–383
Декстрозный эксивалент 70, 129
Дельфинидин 556
Деплетивное взаимодействие 740
Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека теория 738–739
Десмин 870
Диксона зависимости 376
Дилатационный модуль *см.* Модуль вязкоупругости
Диметилсульфид 624
Дисперсии 723, 741–744
Агрегация 743
жидкие 741–744
седиментация 742
Дисперсные системы 721–777
ДЛФО-теория *см.* Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека теория
Добавки пищевые 631–688
функции 680–688
Душица 613
Дхуррин 713

Ж
Жевательные свойства 671–672
Желатин 70, 667, 675, 754
Железо 492–493, 495, 502–504
всасывание 496, 503
обогащение 515–517
усвояемость 503
функциональные свойства 520, 522
Животные трансгенные 1010–1013
использование 1012
Жирные кислоты 156–158
биологическая активность 204
жирнокислотный состав 159–160
КЛК 205
линолевая 158, 185, 188
насыщенные 156
ненасыщенные 156
номенклатура 156
обозначения 157
омега-3 204–205, 617
полиненасыщенные 617
транс-конфигурация 157, 204
цис-конфигурация 157
Жировые глобулы 783
Жиры 154–207, *см. также* Липиды
амфифильные 785
вымораживание 176
гидрогенизация 176–178
гидролитическое прогоркание 182
дегуммирование 175
дезодорирование 175

плотность 165
твердые 165
кривая плавления 168
кристаллизация и плавление 167–168
кристаллическая структура 172–174
молочный 816
нейтрализация 175
низкокалорийные 206
окислительные реакции 182–204
отбеливание 175
переэтерификация 178–179
растительные 932–935
рафинирование 174–175
рост кристаллов 171–172
содержание твердого жира 167–168
фазовые изменения 168–172
фракционирование 176

З
Загустители 667–668, 688
Заменители жира 668–671
Замораживание 67–70, 381–383
Зеаксантин 549, 695
Зимогены 315
Значение pH 22
Зольность 510

И
Изогумулон 595
Изолейцин 214
Изомальтулозосинтаза 352
Изоляты сывороточного белка 266, 836–837
Изомальт, получение 666
Изомальтит 100
Изотермы сорбции влаги 72–79, 82
гистерезис 77–78
Изотиоцианаты 703–705
Изофлавоны 555, 1007–1008
синтез 1008
Имбирь 602, 614
Имидазол 102
Иммуноглобулин 818
Инвертаза 344, 350–351
Индекс нутритивного качества 898–899
Индолы 703–705
Инозитолфосфаты 497–498
Инсулин 243
Инулин 118, 148–149, 929
Ионная сила 738
ИСБ *см.* Изоляты сывороточных белков

Й
Йогурт, объемы производства 814
Йод 492–493, 495, 505, 518
дефицит 505
обогащение 518
функциональные свойства 520
Йодирование соли 518

К
Кадмий 493, 509–510
содержание в продуктах 510
токсичность 509
Казеин 817–818, 824–826, 836–837, 984
анионные кластеры 825
заряд 825
α-казеин 70, 818, 984
β-казеин 267, 818, 984
γ-казеин 818
κ-казеин 818, 826, 984
мицеллы 817, 829–831
производные 843–844
Казеинат натрия 70, 836
Казеиновые препараты, состав 836
Кажущаяся константа диссоциации 331
Калий 501
функциональные свойства 520
Калпаиновая система 403
Кальций 492, 494
биоусвояемость 500–501
функциональные свойства 519, 521
Камеди 110
гелловая 146–147
гуаровая 118, 138
ксантановая 120, 139–140
рожкового дерева 118, 138
Капсаицин 602
Капсантин 549
Карамелизация 101–103
Карамельные колеры 102
Карбоксилэстеразы 322
Карбоксиметилцеллюлоза 111, 116, 137
Карбоксипептидаза 243
Карбонизация 679
Карбонильные соединения 203
Карбоновые кислоты 198

Кардамон 614
Карминовая кислота 579
Карнитин 476
Карнозол 701
β-Каротин 427, 430, 548, 579, 695
Каротиноиды 198, 206, 428, 432, 531, 548–554, 625–626, 694–696
  взаимодействия 804
  изомеризация 553
  окислительное расщепление 625–626
  распространенность 551
  стабильность 553–554
  структура 548, 550–551
  физические свойства 551
  химические свойства 553
Каррагинаны 97, 112, 116, 140–143
  йота-каррагинан 141–142
  каппа каррагинан 141–142
  лямбда-каррагина 141
  PES-каррагинан 143
  синергизм 142
Катализаторы 316
Каталитические реакции 316
Катепсины 854
Катехины 698
  зеленого чая 698
Кверцетин 699, 1006
Кельвина уравнение 733
Кетозамины 793
Кетозы 90
Кислоты неорганические 635
Кислоты органические 634–635
  в овощах и фруктах 936
Клаузиуса-Клапейрона уравнение 52, 77
Клейковина *см.* Глютен
КМЦ *см.* Карбоксиметилцеллюлоза
Кокосовое масло 159
Коллаген 858–863
Коллоиды 724
  взаимодействия 736–741
Комплексообразователи 642–644, 686
Константа диссоциации 640
Конформация «кресло» 92
Концентраты сывороточных белков 836–837
Кориандр 614
Корица 614
Кофактор 315
Кофеин 594
Коэнзим Q10 477
Краевой угол 731–732
Красители 529
  Е-индексы 575
  не подлежащие сертификации 578–581
  нормативные акты 571–572
  пищевые 529, 570–581
  применение 577
  сертифицированные 529, 571–574
Красящие вещества 528–581
  классификация 530
  растительных тканей 940
Крахмалы 88, 114–136
  гидролиз 128–130
  гранулы 122–123, 787
  клейстеризация 123–126
  комплексы 128
  кукурузный 97
  микрофотографии 789
  модифицированные 97, 131–135
  набухающие в холодной воде 135–136
  немодифицированные, применение 125–126
  осахаривание 943–946
  разжиженные 134
  растворимые в холодной воде 135
  растительных тканей 928
  ретроградация 127
  синтез 944
  сшитые 133–134
  трансформация 348
  характеристики 122
КРД *см.* Камеди, рожкового дерева
Креатин 598
Креатинкиназа 864
Кребса цикл 935, 947
КСБ *см.* Концентраты сывороточных белков
Ксилит 96, 664
Ксиланаза 344, 356
Ксилоза 67, 93
Ксилозоизомераза 325, 350
Кумин 614
Курдлан 18, 147
Куркума 580, 614, 701
Кутикула 933
Кутин 935

Л
Лавр благородный 613
Лайнуивера–Берка метод 332
Лактаза 105, 351
α-Лактальбумин 70, 243, 818, 844
заряд 825
структура 828–829
Лактит 664
β-Лактоглобулин 231, 243, 818, 826–827, 844
заряд 825
структура 826–827
Лактоза 67, 88, 105–106, 817, 822–823, 834–835, 838
гидролиз 351
непереносимость 105, 840
области применения 838
Лактопероксидаза 392
Лактоферрин 844
Лапласа давление 732
Лентиновая кислота 606
Лентионин 607
Лейцин 214
Лиганды 488–489
Лигнаны 1001
Лигнин 927
хелатные 489
Лизин 214, 834
-аминогруупа 834
Лизиноаланин 291–292
Лизофосфолипиды 123
Лизоцим 70, 243, 267, 344, 357
L-Лизин 100
биологическая активность 298
Ликопин 550, 695–696, 1007
Линамарин 713
Липазы 182, 322, 337–339, 364–367
применение 365–367
Липоксигеназы 367, 392–395, 608
ингибиторы 395
Липиды 155–207
гидропероксиды 189
измерение степени окисления 201–204
молока 819–822, 831, 838–839
липидный состав 155
неполярные 155
окисление 182–204
оптические свойства 167
полярные 155
продукты окислительного разложения 190–193
реакции в пищевых продуктах 786
термические свойства 166
физико-химические свойства 163–174
электрические свойства 167
Ловушки свободных радикалов 193–194
ЛСР *см.* Ловушки свободных радикалов
Льюиса теория кислот и оснований 488–489
Льюиса основание 592
Лютеин 695

М
Магний 492, 494
функциональные свойства 520
Магниферин 566
Майоран 613
Майяра реакция 98, 298, 609, 622, 715, 790–798, 834
продукты 100, 790–792
скорость 101
субстраты 790
Макроэлементы 487
Мальвидин 556
Мальтит 100
Мальтогексоза 67
Мальтогептоза 67
Мальтодекстрины 129
Мальтоза 104–105
Мальтол 625
Мальтопентоза 67
Мальтотриоза 67
D-маннит 96, 664
Манноза 93
Марганец 520
Маргарин 180, 723
Мацис 614
Масла 155
Масло сливочное 723
объемы производства 814
МГМЖ *см.* Мембраны глобул молочного жира
Меланоидин 100, 445
Мембраны глобул молочного жира 821
Метаболомика 983
Металлы тяжелые 507
Метилкетоны 616
Метионин 215
окисление 294

Метицеллюлоза 120, 137
Микроструктура пищевых продуктов 783–790
Микроэлементы 487
Минеральные вещества 485–523, 941–942
  в сырье животного происхождения 514–515
  в растительном сырье 512–513
  всасывание 498
  обогащение 515–519
  пищевые и токсикологические свойства 492–493
  потери 518–519
  растворимость в воде 487
  содержание в продуктах 511–512
  усвояемость 494–510
  функциональные свойства 519–523
  эссенциальные 491, 499
Миоглобин 49, 243, 530–536
  реакции в мясе 534
  третичная структура 533
Миозин 858, 865–866
Миомезин 870
Миракулин 664
Мирозиназа 398–400, 705, 1006
Михаэлиса константа 331
Михаэлиса–Ментен модель 328
  интегральная форма 331
МКЦ *см.* Микрокристаллическая целлюлоза
Модуль вязкоупругости 734
Мозаицизм 990
Молекулярная подвижность 55–57
Молоко 813–845
  биосинтез 814–816
  витамины 842–843
  гомогенизация 831–832
  микрофотографии 787
  объемы производства 814
  пастеризация 833
  питательные свойства 839–840
  свертывание 361
  соли 822–823
  состав нутриентов 839–840
  термообработка 833, 842
  ферменты 823–824
  химический состав 817–824
Молочная железа коровья, строение 815
Молочный жир 831
Моннелин 657, 663
Моносахариды 88–104
  изомеризация 90–91
  классификация 89
Монотерпены 610–611
Мороженое 768–769
  микрофотографии 789
  объемы производства 814
Мочевина 248
Мука пшеничная, липидный состав 933
Мускатный орех 614
Мясо 533–536
  баранина 850? 879
  белковый гелевый матрикс 888–889
  гидратирование 887
  говядина 850
  замораживание 882–883
  зеленоватое окрашивание 535
  индейки 850
  качество 877
  красное 852
  куриное 850
  нитритный ожог 535
  обработка облучением 884–885
  обработка под высоким давлением 883–884
  пигменты 533–536
  понятие 849
  мраморность 853
  окоченение при размораживании 880–881
  охлаждение 882
  посол 885–886
  реструктуризация 891
  свинина 850
  стабилизация жира 889–891
  состав 849–852
  упаковка 536
  холодильное хранение 882
  холодовое сокращение 879–880
  электростимуляция 881
  DFD 878–879
  PSE 877–878
Мята 613

Н
Нарингинин 563
Натамицин 653
Натрий 492, 501
  функциональные свойства 520

Натрия
бикарбонат 635
додецилсульфат 248
пирофосфат кислый 638
сахаринат 658
хлорид 521–522, 599
Наука о пище 13
аналитический подход 17–18
история 14–17
НГДХ *см.* Неогесперидин дигидрохалкон
Небулин 869
Неогесперидин дигидрохалкон 657, 663
Неоксантин 549
Неотам 657, 659, 661
Нернста распределение 726
Неферментативное потемнение 98, 804
Никель 520, 523
Нитрит 886
Норбиксин 578
Нутригеномика 983
Нутриенты эссенциальные 486
Нутритивная плотность 839

О
Обогащение нутриентами 417–418
Овощи 907, 960
плоды 960–961
степень зрелости 907
Оксидоредуктазы 327
Октановая кислота 650
Олеиновая кислота, инициирование окисления 184
Олигосахариды 104–108
Орегано 613
Осветлители 673–676
Осмопротекторные свойства 380–381
Оствальда созревание 733–734, 763, 773–774
Отбеливатели муки 676–677
Относительное давление водяного пара 50–55
Ощущение во рту 756–758

П
ПАВ *см.* Поверхностно-активные вещества
Пальмоядровое масло 159
Папаин 326–327, 334–335
Паприка 580
Парабены 654
ПГА *см.* Пропиленгликольальгинаты
Пектатлиаза 354
Пектин 927
Пектиназы 354–356
Пектинметилэстераза 369
Пектинэстераза 353–354
Пектины 120, 145–146
ВМ-пектин 145
Пеларгонидин 556
Пеногасители 680
Пенообразование 770–772
Пеностойкость 264
Пентадиены 184
Пентозан 929
Пены 769–775
дренирование 774
изменение структуры 771–772
коалесценция 774–775
нестабильность 772–775
Пеонидин 556
Пепсиноген 243
Пептиды биоактивные 843–845
Перец 602, 614
Пероксидазы 389–392
Пероксиды 199
Петрушка 614
Петунидин 556
Пигменты 529
классификация 531
ксантоновые 566
мяса 532
стабильность 535
Пименто 614
Пиперин 602
Пиразин 102
Пирролохинолин хинон 476
Пирролы 795
Пируват 615
Пищевые волокна 149–150
Празмиды 975
Пластификация 62
Поверхностно-активные вещества 248–249, 727–731, 736
амфифильные 728–730
низкомолекулярные 729
функции 736
Поверхностное натяжение 727–728
градиенты 735–736

Поверхность раздела фаз 726–734
криволинейная 732–734
Подсластители интенсивные, низкокалорийные 657–663, 787
Показатель вспенивания 264–265
Показатель эмульгирующей способности 260–261
Поливинилпирролидон 674–675
Полигалактуроназа 344, 353
Полидекстроза 670
Полиолы 95, 664–667
Относительная сладость 665
энергетическая ценность 665
Полипептиды 225
β-слой 228–229
Полисахариды 108–136, 752–754, 928–930
бета-глюкан 150
взаимодействия 799–804
вязкость и стабильность растворов 110–113
гели 114
гидролиз 114
некрахмальные 929
псевдопластическое поведение 112
растворимость 109–110
степень замещения 132
степень полимеризации 108
Полифенолоксидаза 387
ингибиторы 388
Помольные фракции, содержание жира 934
Порфин 537
Порфирин 536
Пребиотики 148
Проантоцианидины 564–565, 700–701
Пролин 214, 218, 228
Прооксиданты 185–190
контроль 198–199
липоксигеназа 187, 199
синглетный кислород 186, 198
триплетный кислород 187
Пропелленты 679
Пропилгаллат 195, 645
Пропиленгликоль 664
Пропиленгликольальгинаты 144
Пропионовая кислота 649–650
Протеазы 233, 280
аспарагиновые (кислотные) 357–358
металлопротеазы 358–360
сериновые 233, 335, 357
специфичность 280
химозина 335
цистеиновые (сульфгидрильные) 358
Протеасома 876
Протеомика 982
Псевдопластичное поведение 271
Пуллуланаза 344, 346, 370
Пшеница хлебопекарная 972
ПЭС *см.* Показатель эмульгирующей способности

Р

Разделение фаз 803
Разрыхлители 180, 634–638, 688
Растениеводства продукты 899
послеуборочные потери 899
Растения трансгенные, агрономия 991–995
Растительное сырье 897–966
азот небелковый 932
белок резервный 931
генно-модифицированное 994, 1004–1006, 1016–1019
гормоны 913–918
дыхание растений 908–912
жирные кислоты 1001–1003
зерновка, строение 904
клеточная структура 905–906
компоненты с полезными для здоровья свойствами 996–997
корни 903, 905
лекарственное генно-модифицированное 1019–1020
липидный состав 933–935
листья и черешки 902
макронутриенты 998–1003
микронутриенты 1003–1010
метаболизм 946–950
минеральный состав 941
мякоть и побеги 902
обработка ионизирующим облучением 924
органы растений 901–905
отверждение 942
плоды 902–903
пищевые волокна 1000–1001
повреждения при замораживании 921–922
повреждения при охлаждении 922–924
послеуборочные характеристики 902
потери влаги 918–919
потребительская зрелость 908

размягчение 942–943
реакция на стресс 919–925
респираторная модель 911
свойства семейств растений 900
созревшие зерна, семена и орехи 902
способы охлаждения 953–956
стандарты качества 951–952
стебли 902
степень зрелости 951–952
съедобные части 901
токсины 1010
транспортировка и хранение 957–959
увядание 907
углеводы 999–1000
физические повреждения 920–921
цветки 902
Раффиноза 106, 930
Реакции β-расщепления 189, 191–192
Реакции порчи 21
Редуктоны 100
Ренея никель 95
Реннин 335
Ресвератрол 701
Ретинол 427
Рибоза 67, 93
Рибозимы 978–979
Рибопереключатели 978
Рибонуклеаза 243
РНК-сайленсинг 978–980
РНП 418
Розанова структура 90
Розмарин 613
Розмарина экстракты 196–197
Рутин 564
Ртуть 493, 508–509
содержание в гидробионтах 509
токсичность 508–509

С
Салатрим 669
Сарколемма 854
Саркомер, структура 855–856
Сахарин 593, 657
безопасность 659
Сахарные спирты *см.* Полиолы
Сахароза 67, 88, 106–107
полиэфиры 671
Свинец 493, 507–508
Сезаминол 709
Селен 492, 495, 505–507
источники 506
дефицит 506
потребление 507
функциональные свойства 520
Селенометионин 505
Селеноцистеин 215, 505
Сера, функциональные свойства 520
Серин 215, 505
Серы диоксид 646–647
Сквален 934
Силы стерического оттлакивания 739–740
Ситостерин 935
Скатчарда уравнение 269
Скорость реакций в растворе 56
Сливки 832
Смолучковского уравнение 56
Соланин 714
Соль поваренная *см.* Натрия хлорид
Сорбиновая кислота 650–651
Сорбит 67, 95, 664–665
этерификация 97
Сорбитаны 97–98, 665
Состав газовой среды 23
Спэны 97, 667
получение 667
Срок хранения 22
Стабилизаторы 667–668, 688
Стабильность и порча продуктов 20–21
внутренние факторы 21
допущения 63
Стабильность эмульсии 261–262
Стахиоза 106, 930
Стевиозид 657, 663
Стерины 162, 934
СТЖ *см.* Жиры, содержание твердого жира
Стокса–Эйнштейна уравнение 56
Субтилизин 323, 985
Сукралоза 657, 661–662
Сульфиты 646–647
Супероксид-анион 199
Сурими 891–892
Сушка 71–72
Сфинголипиды 162
Сфингомиелин 162

Сыворотка молочная 832
Сывороточные белковые препараты, состав 836
Сыр, объемы производства 814

Т
ТАГ *см.* Триацилглицерины
Тангеретин 699
Таннины 565–566, 603–604, 937–940
гидролизуемые 937
конденсированные 603–604, 700–701, 937
Тауматин 657
ТБК-тест 203
Твердые триглицериды 176
Твины 98, 667
получение 667
Теафлавин 939
черного чая 698
Текстура 756–758
Температура стеклования 22
углеводов 67
Тендеризация мяса 361–362, 403
Теобромин 594
Термолизин 363
Терпеноиды 610–611
Тестообразование 276–279, 362, 809
Тетрапирролы 531
Тетратерпеноиды 531
Тиазолин 624
Тиксотропное течение 113
Тимьян 613
Тиолы 197
Тирозин 214
окисление 297
Титин 225, 868–869
Ткани мышечные, структура 852–874
возбуждения-сокращения механизм 871–873
гладкие 857
посмертные изменения 875
сердечная мышца 857
скелетные 852–867
типы 873–874
Ткани растительные 925–951
компоненты клеточной стенки 927
химический состав 925–927
Тмин 614
Токотриенолы 434–435
Токоферолы 194–195, 434–435
Токсиканты растительного происхождения 710–715
Трансглутаминаза 307, 363–364
Трансферазы 339
Трансформация растений 989–991
Трегалоза 67
Треонин 215
Третичный бутилгидрохинон 195
Триацилглицерины 158, 163, 788
молока 819–820
жирнокислотный состав 821
полиморфизм 173–174
роль в пищевых продуктах 179–182
термические свойства 166
Триметиламин 620
Трипсина ингибитор 243
Трипсиноген 243
Триптофан 214
окисление 294–296
Тропомиозин 855, 867
Тропонин 868
ТТГ см. Твердые триглицериды
Туннелирование 327

У
Углеводы 87–150
растительных тканей 927
реакции в пищевых продуктах 785
Углерод, хиральный атом 89
Укроп 614
Уксусная кислота 640
Уроновые кислоты 96
Урсоловая кислота 935
Усиление вкуса 362–363

Ф
Фазеолин 230, 282
Фелинга реактив 94
Фенилаланин 214, 615
Фенилтиокарбамид 598
Фенолоксидазы 385–389
гидроксилирование 385
Фенольные кислоты 936–938
биосинтез по пути шикимовой кислоты 938
Фентона реакция 197
Фенхель 614
Феофитины 541–542
Ферментативное потемнение 386–387

Ферментативные реакции 328
кинетика 328–334
Ферменты 313–405
активность 368–383
активные центры 319–320
аминокислоты 319
генная инженерия 981–982, 985–988
каталитические свойства 315–328
классификация 339–341
концентрация 384
номенклатура 339–341
пектинолитические 403
применение в пищевых продуктах 341–368
протеолитические 334–336
специфичность и селективность 334–341
стабильность 372
экзогенные 314, 316
эндогенные 314, 383–405
Фибриллы белковые 786
Филамин 870
Фитаты 497
Фитиновая кислота 497–498
Фитонутрицевтики 705
Фитостерины 162, 205, 934
Фишера проекция 89
Фишера система нумерации 536
Флавины 451
Флавоноиды 531, 563, 696–700
источники 696
Флавононолы 555, 697
Флавононы 555, 563
Флавоны 555, 697
Флавилий 555
Флейвор 588
Фолиевая кислота 463
Форбин 537
Формальдегид 620
ФОС *см.* Фруктоолигосахариды
Фосфаты 520–521, 641–642
Фосфолипазы 368
Фосфолипиды 161, 501
Фосфор 492, 494, 501
Фруктоза 67, 93
D-фруктоза 90, 130
Фруктоолигосахариды 149–149
Фрукты 961–962
Фтор 495
Фуранеол 624
Фураны 98
Фурцеллеран 143

Х

Хаконин 714
Хаотропные соли 249
Хейнса перегруппировка 298
Хейнса–Вулфа зависимость 332
Хейуорта проекция 91–92, 497
Хелаты 489–490
Хеместезис 592
Химики-пищевики 23–25
Химозин 335–336, 984
рекомбинантный 985
Химотрипсиноген 243
Хинин 594
Хинина гидрохлорид 594
Хиноны 531, 566
Хлебобулочные изделия 809–810
Хлебопекарные улучшители 676–677
Хлор 502
Хлорофилл 531, 536–548
алломеризация 543
медные комплексы 547
модификация 539–544
обесцвечивание 544
производные 537–538
спектральные свойства 538
структура 536–537
фотодеградация 544
Хлорофиллиды 545
Хлороформ 593
Холестерин, окисление 193
Холин 475–476

Ц

Цвет 529–530
мяса 530
Цвиттер-ион 216
Целлюлоза 136–138, 927
микрокристаллическая 136–137
Цианидин 556
Цикламат 657
гидролиз 658
Циклоамилозы 107
Циклодекстрины 107–108
растворимость 108

Цикломальтодекстринтрансфераза 344, 347
Циклотен 624
Цинк 492–493, 495, 504, 517–518
дефицит 504
обогащение 517–518
усвояемость 504
функциональные свойства 520
Цистеин 197, 215, 505
окисление 294
Цистин, окисление 294
Цитокины 913
Цитохром С 243

Ч
Чабер 613
Чай 697–698, 939
Черствение 127–128

Ш
Шалфей 613
Шапероны 924
Шардингера декстрины 107
Шафран 580, 614
Шиитаке (гриб) 606–607
Шикимая кислота, метаболический путь 609–610
Шиффа основания 98, 100, 457, 793
Шогаолы 702
Шортенинги 180
Штрекера расщепление 100, 297, 622, 625

Э
Эдди–Скетчарда зависимость 332
ЭДТА 490, 642–644
Экспрессия генов 912–
Эластаза 243
Энергия активации 318
Энзимы *см.* Ферменты
Эмульгирующей активности индекс 761
Эмульсии 724, 758–769
«вода-в-масле» 783, 798
коалесценция 764–769
«масло-в-воде» 724
образование 759–760
нестабильность 762–764
Эпигаллокатехин 698, 939
Эпикатехин 698, 939
Эпоксиды 655
Этилен 913–918
биосинтез 914–916
действие 916
Эритрит
Эстрагон 613

Я
Ягоды 961
Яичный альбумин 243
Янга цикл 915

A
AI (адекватный уровень потребления) 493
Aspergillus candidus 80
Aspergillus chevalieri 80
Aspergillus echinulatus 80
Aspergillus niger 350

B
Bacillus 80, 130
BET-модель *см.* Брунауэра–Эмметта–Теллера модель
BET-монослой 81
BHA см. Бутилированный гидроксианизол
BHT см. Гидрокситолуол

C
Candida 80
Clostridium botulinum 80
Clostridium perfringens 80

D
Debaryomyces 80
DRI 491, 494

E
EAR (оценочная средняя потребность) 493
Escherischia Proteus 80

F
FD&C (код) 529

G
GAB-модель 73

H
Hansenula 80

I
INQ см. Индекс нутритивного качества

K
Klebsiella 80

L
Lactobacillus 80
LOX *см.* Прооксиданты, липоксигеназа

M
Micrococcus 80
Monascus bisporus 80

P
Penicillium roqueforti 650
Pichia 80
Pseudomonas 80

R
RDA 418, 420, 491, 493
RDI 419–420
Rhodolorula 80

S
Saccharomices baillii 80
Saccharomices bisporus 80
Saccharomices rouxii 80
Salmonella 80
SDS *см.* Натрия додецилсульфат
Serratia 80
Shigella 80
Simpless (препарат) 246
Sphyngomonas elodea 146
Staphylococcus aureus 52, 80

T
TBHQ см. Третичный бутилгидрохинон
TMAO-деметилаза 404–405
Torulopsis 80

U
Ul (верхний допустимый уровень потребления) 493

V
Vibrio parahaemolyticus 80

W
Walliemia sebi 80

Химия пищевых продуктов

Шринисаван Дамодаран
Кирк Л. Паркин
Оуэн Р Феннема
(ред.-сост.)

Перевод с английского языка

ISBN 978-5-904757-24-3



Издательский дом «Профессия»
Санкт-Петербург, 191002, а/я 600
Те./факс (812)740-12-60 URL: www. professija. ru
e-mail: bookpost@professija.ru

Подписано в печать 05.08.2012. Формат 84 × 108/16.
Усл. печ. л. 83,85

Заказ № 123.
Отпечатано с готовых диапозитивов
в типографии ООО "ИПК Бионт"
г. Санкт-Петербург, Средний пр., дом 86
Тел.: (812) 322-68-43