

ХРАНЕНИЕ ЗАПАХА

Т.Н. Волкова, М.В. Лукошкина, канд. хим. наук Г.А. Одоева –
Гипрорыбфлот

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В РЫБНЫХ ПРОДУКТАХ

Сульфгидрильные группы (SH-группы), благодаря наличию подвижного атома водорода, активно включаются в целый ряд биохимических реакций и играют большую роль в формировании запаха и вкуса пищевых продуктов в процессе приготовления и хранения. При мягкой тепловой обработке животных белков происходит разворачивание белковых молекул, вследствие чего возрастают доступность SH-групп и повышение их реакционной способности. При повышении температуры выделяется сероводород, который в небольших концентрациях способствует образованию нормального аромата продукта, а при более высоких температурах вызывает неприятный запах и может приводить к коррозии консервных банок и изменению окраски продукта. С участием сульфгидрильных групп образуется ряд веществ, определяющих запах и вкус продукта: меркаптаны, тиозиферы, циклические серосодержащие соединения.

При нагревании в результате окисления свободных сульфгидрилов, расположенных в благоприятных стерических условиях, возникают дисульфидные мосты, связывающие друг с другом участки пептидных цепей и укрепляющие текстуру белков, что тоже влияет на вкусовые качества продукта.

Содержание SH-групп или величина соотношения SH/SS (дисульфидные группы) прямо пропорциональны окислительно-восстановительному потенциалу продукта и свидетельствуют о его способности противостоять самоокислению в процессе хранения. Восстанавливающая способность сульфгидрильных групп позволяет использовать некоторые продукты белкового распада в качестве антиоксидантов для предотвращения порчи пищевых масел и жиров. При этом антиокислительный эффект добавки пропорционален содер-

жанию сульфгидрильных групп, открываемых в процессе гидролиза белков некоторыми протеазами.

SH-группы реагируют с рядом токсичных веществ, связывая в нереакционно-способные комплексы ионы тяжелых металлов, полициклические углеводороды и митотоксины, выполняя важную функцию вывода из организма ядов.

Таким образом, не подлежат сомнению важность контроля содержания сульфгидрильных групп в рыбных белках и актуальность разработки простой и эффективной методики его определения.

Для определения содержания сульфгидрильных групп белков предложены различные методы. В настоящее время чаще всего применяют меркаптидообразующие, дисульфидные и алкилирующие реагенты с фиксацией результата спектрофотометрическим или амперометрическим титрованием. В большинстве случаев достаточно специфичные и чувствительные методы определения содержания сульфгидрильных групп в белках трудоемки и требуют использования сложных реагентов.

Целью нашего исследования была разработка метода определения общего содержания сульфгидрильных групп рыбных белков, который обладал бы высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью, не требуя при этом сложных дефицитных реагентов или оборудования для амперометрического титрования.

Молекулярный йод в среде 1М раствора йодистого калия при pH 7,6 и температуре 20 °С взаимодействует со свободными сульфгидрильными группами белков и низкомолекулярных соединений гомогената рыбной ткани. Общим недостатком окислителей, применяемых в качестве реагентов на сульфгидрильные группы, является их способность окислять другие функциональные группы белков, в особен-



ности остатки тирозина, триптофана и метионина. При обработке йодом может, кроме того, происходить йодирование циклических групп тирозина и гистидина. Необходимо также учитывать возможность «чрезмерного» окисления SH-групп, т.е. переход серы в более окисленное состояние, чем в дисульфиде (образование сульфинатов или сульфонов), в результате чего меняется стереохимия реакции.

Скорость и характер окисления SH-групп зависят от соотношения окислительно-восстановительных потенциалов сульфгидрила и окислителя, концентрации реагентов, pH и температуры реакционной среды. Для обеспечения специфичности взаимодействия йода с сульфгидрильными группами и эквивалентного взаимодействия окислителя и восстановителя необходимы следующие условия: не менее чем одномолярная конечная концентрация йодистого калия в пробе и повышение pH среды до 7,6.

Оптическая плотность растворов йода при фотоколориметрии со светофильтром 500 нм увеличивается прямо пропорционально концентрации йода и не зависит от количества внесенного крахмала и присутствия постороннего красящего вещества и коллоида. Это дало возможность применить метод автоматического фотоколориметрического титрования для определения содержания сульфгидрильных групп белков и небелковых тиолов.

Для осуществления метода используются фотоэлектроколориметр КФК-2 (длина волны 490±10 нм) с титровальным приспособлением ТПР-М; лабораторные весы 2-го и 3-го классов точности; гомогенизатор, холодильник, аквадистиллятор, pH-метр, электроплита, а также стандартная химическая посуда.

Для определения сульфгидрильных групп методом автоматического йодомет-

рического титрования необходимы следующие реактивы: вода дистиллированная; химически чистые фосфат калия однозамещенный и фосфат натрия двухзамещенный; натрий хлористый (ЧДА); химически чистый калий йодистый; йод (фиксаналы, нормадозы), 0,1 г-экв; крахмал водорастворимый. Перед проведением анализа необходимо приготовить следующие реактивы: 1/15М-фосфатный буфер (рН 7,6), 3М-раствор хлористого натрия, 3М-раствор йодистого калия, 5%-ный раствор крахмала и 0,001 N-раствор йода.

Для определения содержания сульфгидрильных групп целесообразно взять сразу же после приготовления несколько точных навесок средней пробы в бюксы с притертыми пробками и ткань тут же заморозить ($t \leq -15$ °С). Замороженная проба может храниться в течение 2 мес. без заметного изменения содержания SH-групп. Хранение же ткани при комнатной температуре и даже при -10 °С приводит к интенсивному снижению содержания сульфгидрильных групп.

Навеску средней пробы (1 г), взятую с точностью 0,0001 г, гомогенизируют с небольшим количеством дистиллированной воды (1–2 см³) на холоде. Гомогенат переносят в мерную колбу объемом 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой. Его можно хранить в холодильнике в течение 4–6 ч.

Для титрования используют кювету длиной 15 мм с максимальным объемом 24 см³ (оптимальный объем заполнения равен 18–21 см³). Для оптимального заполнения рабочей кюветы рассчитаны количества реагентов. В зависимости от содержания сульфгидрильных групп в пробе в кювету вносят 2 или 3 см³ гомогената, 3 см³ 3М-раствора NaCl, 9 см³ буферного раствора, 7 см³ 3М-раствора йодистого калия и 8 капель 5%-ного раствора крахмала.

Фотокolorиметр КФК-2 прогревают 15 мин. при открытом кюветном отделении. Работу ведут при длине волны 490 ± 10 нм. Кювету устанавливают в кюветное отделение и закрывают крышку, к которой подводят титровальное приспособление. Мешалку погружают в кювету примерно на половину объема раствора. Скорость вращения мешалки постепенно увеличивают, при этом весь объем раствора интенсивно перемешивается и не должно возникать пузырей воздуха и брызг, что влияет на показания оптической плотности. Для повышения точности метода желателен использовать всегда близкие скорости вращения мешалки.

Значение оптической плотности устанавливают равное 0,2. Бюретку заполня-

ют 0,001 N-раствором йода и приливают в кювету по 0,1 см³ этого раствора. Показания по шкале оптической плотности отсчитывают через 10–20 с после каждого добавления, после того как стрелка амперметра перестанет колебаться. Записывают объем внесенного раствора йода и соответствующее значение оптической плотности. Титруют до достижения значений оптической плотности 0,6. Титрование повторяют 3–5 раз. Гомогенат каждый раз тщательно перемешивают, пипетку промывают взвесью.

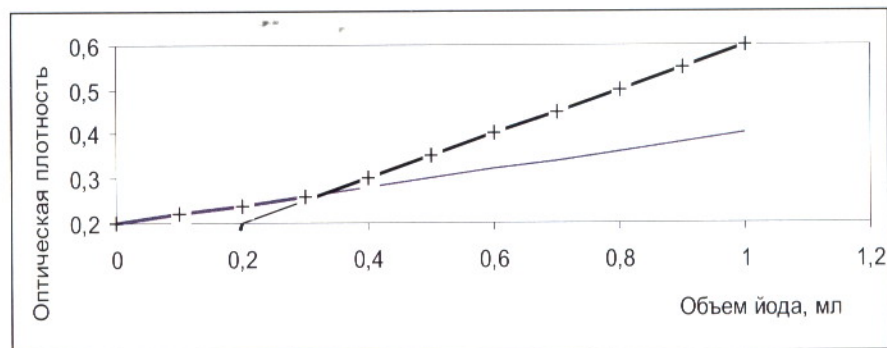
По результатам каждого титрования строят график (см. рисунок). Найдя на графике точку эквивалентности, в которой наблюдается резкий перегиб (изменение направления линии), определяют на оси абсцисс объем прилитого раствора йода, соответствующего этой точке.

Общее содержание сульфгидрильных групп в пробе (в микро-эквивалентах SH-групп на 1 г навески) рассчитывают по формуле:

$$SH = \frac{A \times V_1}{2 \times V_2 \times m},$$

где: A – количество микро-эквивалентов йода, численно равное объему 0,001 N-раствора йода; V_1 – объем, до которого доведена навеска гомогената, см³; V_2 – объем гомогената, взятый для титрования, см³; m – навеска средней пробы, г; 2 – коэффициент пересчета количества микро-эквивалентов йода на число микро-эквивалентов сульфгидрильных групп.

Для выполнения измерений общего содержания сульфгидрильных групп в рыбных консервах или другом белковом объекте нет необходимости в построении градуировочного графика, так как количество сульфгидрильных групп рассчитывается по кривой титрования. Правильность приготовления растворов время от времени можно проверять по оттитровыванию сульфгидрильных групп в чистом цистеине.



Зависимость оптической плотности раствора гомогената рыбных консервов «Судак в желе» от объема добавленного раствора йода

Простой и эффективный метод определения содержания сульфгидрильных групп в рыбе и рыбной продукции, разработанный в лаборатории биохимии Гипрорыбфлота, не требует использования дорогих дефицитных реактивов и сложного оборудования. Для метрологической аттестации метода в качестве объекта испытания использовали рыбные консервы. Согласно аттестату государственного сертификационного испытательного центра НПО ВНИИМ им. Д.И. Менделеева методика определения содержания сульфгидрильных групп в рыбных консервах имеет следующие метрологические характеристики: нижний предел измерения массовой концентрации сульфгидрильных групп равен 0,2 микро-эквивалента на 1 г продукта; верхний предел практически не ограничен, так как за счет разбавления проб можно подобрать оптимальное количество продукта, где объем пошедшего на титрование 0,001 N-раствора йода не превышал бы 6 см³; относительная погрешность измерения общего содержания сульфгидрильных групп в рыбных консервах составляет 15 %.

**Volkova T.N., Lukoshkina M.V.,
Odoeva G.A.**

Detection of sulfhydryl groups in fish products

In the biochemistry laboratory of Giprorybflot, the simple and efficient method is developed for determining the sulfhydryl (SH) groups concentration in fish and fish products. Because of the presence of mobile hydrogen atom in SH-groups, they can actively participate in a wide spectrum of biochemical reactions. Thus, SH-groups can greatly influence the specific scent and taste of food products during their processing and storing. As an object under test for the method's metrological certification, fish canned products have been used.