Применение ферментативно-алкалометрического способа для идентификации сливочного и пальмового масел

Алла В. Никулина ¹	nik_a_68@mail.ru
Татьяна И. Парыгина ¹	parygina.tatyana2014@yandex.ru
Татьяна А. Кучменко ¹	tak1907@mail.ru

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

Реферат. В настоящее время товарная категория «сливочное масло» широко фальсифицируется жирами немолочного происхождения, в основном пальмовым маслом. Методики, рекомендуемые для обнаружения пальмового масла в продуктах масложировой промышленности, требуют длительной пробоподготовки или применения дорогостоящего сложного в эксплуатации оборудования, что делает актуальным поиск новых, более экспрессных методов анализа, применимых для работы в небольших лабораториях. Предложен ферментативно-алкалометрический способ, позволяющий различить пальмовое и сливочное масла. Метод заключается в ферментативном гидролизе масла с последующим титриметрическим определением количества выделившихся жирных кислот с визуальным фиксированием точки эквивалентности, титрант – водный раствор гидроксида натрия (0,1 моль/дм³), индикатор – фенолфталеин. В качестве фермента применяли панкреатическую липазу. Изучено влияние активности фермента, pH среды, температуры и времени на гидролиз пальмового и сливочного масел. Особенностью разработанного способа является использование неоптимальных условий проведения расщепления липидов, что позволяет снизить скорость реакции для установления тонких различий гидролиза жиров различного состава. Обоснованы условия проведения идентификации масел – при pH=7,9 (водный раствор тетрабората натрия 1% масс.), в присутствии панкреатической липазы 20000 расщепление пальмового масла начинается через 25 мин после начала опыта, сливочного – через 10 мин. Оптимальное время гидролиза, позволяющее отличить пальмовое масло от сливочного – 20 мин. Идентификацию масел проводят сравнением результатов алкалометрического титрования продуктов расщепления через 5 мин (V5') и 20 мин (V20') после начала гидролиза изучаемого масла с панкреатической липазой 20000. Если анализируемая проба содержит только сливочное масло, то $V20' / V5' \geq 2$. Численно равные значения V5' и V20' получаются при анализе пальмового масла. Величина $V20' / V5'$, находящаяся в интервале от 1 до 2, свидетельствует, что анализируемый образец – спред, и чем ближе значение $V20' / V5'$ к 1, тем больше в пробе пальмового масла. Предлагаемый способ экономичен и прост в исполнении, применим в интервале температур 17–27 °C.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, пальмовое масло, сливочное масло, алкалометрическое титрование

Application of enzymatic alkalimetric method for identification of cream and palm oils

Alla V. Nikulina ¹	nik_a_68@mail.ru
Tat'yana I. Parygina ¹	parygina.tatyana2014@yandex.ru
Tat'yana A. Kuchmenko ¹	tak1907@mail.ru

¹ Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

Summary. Nowadays the "butter" product category is widely falsified by non-dairy fats, mainly by palm oil. The methods recommended for the detection of palm oil in the fat- and oil industry products require a long-term sample preparation or the use of expensive complex equipment, which makes it urgent to search for new, more rapid analytical methods that can be used in small laboratories. An enzymatic- and alkalimetric method distinguishing between palm oil and butter is suggested in the work. The method consists in enzymatic hydrolysis of fat followed by titrimetric determination of the amount of excreted fatty acids with visual fixation of the equivalence point; titrant is the aqueous sodium hydroxide solution (0.1 mol / dm³) and indicator is phenolphthalein. Pancreatic lipase was used as the enzyme. The effect of enzyme activity, the medium pH, temperature and time on the hydrolysis of palm oil and butter was studied. The developed method peculiarity is the use of non-optimal conditions for lipid splitting. This makes it possible to reduce the rate of reaction to establish fine differences in the hydrolysis of different compositions fats. Conditions for the identification of fats - at pH = 7.9 (aqueous solution of sodium tetraborate 1% by weight) were justified. In the presence of pancreatic lipase 20000, the splitting of palm oil begins in 25 minutes after the experiment start, and butter splitting begins after 10 minutes. Optimum hydrolysis time allowing to distinguish between palm oil and butter is 20 min. Identification of fats is carried out by comparing the results of alkalimetric titration of the splitting products after 5 minutes (V5') and 20 minutes (V20') after the beginning of hydrolysis of the fat under study with the pancreatic lipase 20000. If the sample analyzed contains only butter, then $V20' / V5' \geq 2$. Numerically equal values of V5' and V20' are obtained when analyzing a palm oil. The value $V20' / V5'$, which is in the range of 1-2 indicates that the analyzed sample is a spread, and the closer the value of $V20' / V5'$ to 1, the more palm oil the sample contains. The proposed method is economically efficient and simple in its procedure, it is applicable in the temperature range of 17–27 °C.

Keywords: enzymatic hydrolysis, palm oil, butter, alkalimetric titration

Для цитирования

Никулина А.В., Парыгина Т.И., Кучменко Т.А. Применение ферментативно-алкалометрического способа для идентификации сливочного и пальмового масел // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 1. С. 240–244. doi:10.20914/2310-1202-2018-1-240-244

For citation

Nikulina A.V., Parygina T.I., Kuchmenko T.A. Application of enzymatic alkalimetric method for identification of cream and palm oils. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2018. vol. 80. no. 1. pp. 240–244. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2018-1-240-244

Введение

В настоящее время широко распространена фальсификация продукции в товарной категории «сливочное масло» жирами немолочного происхождения. По данным Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Воронежской области за 9 месяцев 2017 года 27 из 32 проб являются несоответствующими по показателям жирно-кислотного состава [1].

Потребление человеком значительных количеств пальмового масла влияет на его здоровье, вызывая переизбыток, привыкание к определенной марке продукта, ожирение, заболевания сердечнососудистой системы, увеличение содержания холестерина и риска развития онкологических заболеваний [2, 3].

В настоящее время для обнаружения пальмового масла в продуктах масложировой промышленности рекомендуется применять газовую хроматографию [4]:

1) арбитражный способ – ГОСТ 31979-2012, включающий в себя омыление анализируемых липидов (30 мин), получение осадка дигитонинов стероидов (12 ч), растворение их и экстракция пентаном с последующим газожидкостным хроматографированием.

2) способ, основанный на определении соотношения массовых долей эфиров определенных жирных кислот (ГОСТы 31663-2012, 31665-2012) с предварительным выделением органической фазы из анализируемого масла с последующим омылением и очисткой (фильтрование, центрифугирование).

При проведении технического контроля на предприятиях масложировой промышленности для определения присутствия молочного жира в спредах применяют число Рейхерта-Мейссля [4] (объем раствора щелочи необходимый для нейтрализации летучих водорастворимых жирных кислот, полученных из 5 г жира) и методику (ГОСТ 34178-2017, ГОСТ Р 52100-2003) включающую омыление пробы жира (20 мин), перегонку с водяным паром (30 мин) с последующим титрованием дистиллята. Известно применение метода инфракрасной спектроскопии для определения подлинности молочного жира [5].

Длительность и сложность пробоподготовки, применение дорогостоящего оборудования в рекомендуемых методиках, определяет актуальность поиска новых, более экспрессных методов анализа, в том числе для работы в небольших лабораториях.

Пальмовое масло в отличие от других масел, в том числе молочного жира, характеризуется

повышенной устойчивостью к внешним воздействиям – у него самые высокие для масел температура плавления, индекс окислительной устойчивости. Это позволяет предположить повышенную устойчивость пальмового масла к ферментативному воздействию липаз.

Изучен ферментативный гидролиз пальмового (ПМ) и сливочного домашнего (СлМ) масел, катализируемый панкреатической липазой (Ф) 20000 (6000) [6]. Для растворения липазы использовали среду с различными pH (6,0 – дистиллированная вода; 7,9 – водный раствор тетрабората натрия 1% масс.; 8,4 – водный раствор карбоната натрия 1% масс.). При расщеплении липидов образуются жирные кислоты [7], количество которых можно оценить по объему раствора гидроксида натрия $V(\text{NaOH})$, затраченного на реакцию с превращенным субстратом.

За основу разработки способа расщепления липидов выбрана методика определения активности липазы [8]. Для реверсного применения подхода необходимо изменить основные условия проведения реакции – pH, температура (t , °C), время (τ , мин или ч) – так, чтобы снизить скорость реакции для установления тонких различий гидролиза жиров различного состава.

Общая схема проведения анализа состоит в следующем: навеску масла обрабатывают горячей водой или раствором соли (в зависимости от создаваемого pH среды) до полного плавления жира и взбалтывают для получения эмульсии. После охлаждения до рабочей температуры в пробу вводят фермент (панкреатическую липазу). Проводили гидролиз в течение различного времени, периодически помешивая. Выделившиеся в результате ферментативного расщепления триглицеридов кислоты оттитровывали фиксальным раствором гидроксида натрия ($0,1000 \text{ моль/дм}^3$) в присутствии индикатора фенолфталеина.

При алкалиметрическом титровании продуктов расщепления липидов могут возникнуть трудности на стадии фиксирования точки эквивалентности из-за мутности титруемого раствора. В этом случае титрование следует проводить, сверяя окраску с контрольным образцом окраски. Для его приготовления в один из образцов после ферментативного гидролиза добавляют $0,4 \text{ см}^3$ сернокислого кобальта 2,5 масс. % (фиксирование точки эквивалентности аналогично методу определения кислотности молока, ГОСТ Р 54669-2011).

Известно, что максимальная активность панкреатической липазы достигается при pH = 8–9, температура 36,7 °C [9]. При соблюдении этих условий происходит практически полное разложение всех жиров в течение 1 часа.

Особенностью разработанного способа является использование неоптимальных условий проведения гидролиза, что позволяет провести реакцию с меньшей скоростью. Так, при температуре 20 °С при pH среды 8,4 полное разложение триглицеридов сливочного масла Ф 20000 происходит за 4 ч вместо 1 ч, при pH 6,0 необходимо более 5 ч (рисунок 1).

Рисунок 1. Кинетика накопления кислот при гидролизе сливочного масла, катализируемом панкреатической липазой 20000, при pH среды 8,4 (1) и 6,0 (2)
Figure 1. Kinetics of acids accumulation during the hydrolysis of butter, catalyzed by pancreatic lipase 20000, at the medium pH of 8.4 (1) and 6.0 (2)

Различия гидролиза сливочного и пальмового масел особенно проявляются в течение первого часа проведения реакции (рисунок 2). Применение неоптимальных условий гидролиза определяет задержки начала расщепления масел во времени – индукционный период (ИП).

Более высокие значения объемов гидроксида натрия, затраченные на титрование продуктов гидролиза сливочного масла объясняются наличием в нем свободных жирных кислот.

При применении панкреатической липазы 6000 при pH 6,0 и 7,9 (рисунок 2, b, c) индукционный период наблюдается при гидролизе и пальмового, и сливочного масел, следовательно, эти условия не пригодны для идентификации. При pH 8,4 (рисунок 2, a) ИП выявлен только при расщеплении ПМ, в первые 10 мин реакции кислоты присутствуют только в превращенном субстрате сливочного масла, в титруемом образце пальмового масла их нет. Однако объемы гидроксида натрия, затраченные на титрование в обоих случаях различаются незначительно, что затрудняет идентификацию.

Панкреатическая липаза 20000 значительно активнее Ф 6000, ферментативное расщепление триглицеридов сливочного и пальмового масел при pH = 8,4 не имеет индукционного периода (рисунок 2, d). При pH 7,9 и 6,0 (рисунок 2, e, f) ИП наблюдается только при гидролизе пальмового масла. Объемы гидроксида натрия, затраченные на титрование его образцов не изменяются в течение первых 20 мин реакции, в то время как результаты титрования превращенного субстрата с образцами сливочного масла значительно отличаются во времени. Различия в скорости накопления кислот максимальны при pH 7,9.

Рисунок 2. Кинетика накопления кислот при гидролизе сливочного (1) и пальмового (2) масел, катализируемом панкреатической липазой 6000 при pH среды 8,4 (a), 7,9 (b), 6,0 (c) и панкреатической липазой 20000 при pH среды 8,4 (d), 7,9 (e), 6,0 (f)

Figure 2. The kinetics of acids accumulation in the hydrolysis of butter (1) and palm oil (2) catalyzed by pancreatic lipase 6000 at pH of 8.4 (a), 7.9 (b), 6.0 (c) and pancreatic lipase 20000 at medium pH of 8.4 (d), 7.9 (e), 6.0 (f)

При выбранном pH (водный раствор тетрабората натрия 1% масс.) в присутствии панкреатической липазы 20000 расщепление пальмового масла начинается через 25 мин после начала опыта, сливочного – через 10 мин. Оптимальное время гидролиза, позволяющее отличить пальмовое масло от сливочного – 20 мин. Идентификацию масел можно провести сравнением результатов алкаиметрического титрования продуктов расщепления масел через 5 мин (V_5') и 20 мин (V_{20}') после начала гидролиза изучаемого масла с панкреатической липазой 20000. Если анализируемая проба

содержит только сливочное масло, то $V_{20}'/V_5' \geq 2$. Численно равные значения V_5' и V_{20}' получаются при анализе пальмового масла. Величина V_{20}'/V_5' , находящаяся в интервале от 1 до 2, свидетельствует, что анализируемый образец – спред, и чем ближе значение V_{20}'/V_5' к 1, тем больше в пробе пальмового масла.

Проведение анализа при неоптимальной для гидролиза липаз температуре нивелирует ее влияние на эффективность работы фермента (таблица 1), позволяя работать в большом диапазоне температур, упрощая обязательные условия анализа.

Таблица 1.

Влияние температуры на эффективность ферментативного гидролиза сливочного масла, катализируемого панкреатической липазой 6000, pH = 7,9

Table 1.

The temperature effect on the efficiency of butter enzymatic hydrolysis catalyzed by pancreatic lipase 6000, pH = 7.9

Время, мин Time, min	Температура, °C Temperature, °C					
	16	17	20	26	27	28
	Объем NaOH, см ³ Volume NaOH, sm ³					
10	0,45	0,55	0,60	0,60	0,70	0,80
20	0,90	1,05	1,10	1,10	1,15	1,20

Заключение

На основании полученных результатов разработан способ идентификации сливочного и пальмового масел с применением ферментативно-алкаиметрического анализа. Для этого проводят ферментативный гидролиз образца панкреатической липазой 20000 при pH = 7,9

(водный раствор тетрабората натрия 1% масс.), $t = 22 \pm 5$ °C, время гидролиза 5 и 20 мин с последующим титрованием продуктов гидролиза водным раствором гидроксида натрия с молярной концентрацией 0,1000 моль/дм³.

Предлагаемый способ экономичен и прост в исполнении. Время проведения анализа 30 мин.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Воронежской области. О контроле за качеством и безопасностью молока и молочной продукции. 2017. № 2. URL: <http://36.rospotrebnadzor.ru/news/18637>.
- 2 Исследования и аналитика greengu.ru. Пальмовое масло: дешево и вредно. 2017. № 5. URL: <http://greengu.ru/palmovee-maslo-deshevo-i-vredno>.
- 3 Bowen-Forbes C. S., Goldson-Barnaby A. Fats // Pharmacognosy. 2017. P. 425-441.
- 4 Deelstra H., Burns D. T., Walker M. J. The adulteration of food, lessons from the past, with reference to butter, margarine and fraud // European Food Research and Technology. 2014. V. 239. №. 5. P. 725-744

- 5 Nurrulhidayah A. F. et al. Authentication analysis of butter from beef fat using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics // International Food Research Journal. 2013. V. 20. №. 3.

- 6 Zaharudin N. A. et al. Enzymatic Hydrolysis of Used Cooking Oil Using Immobilized Lipase // Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes. Springer, Singapore, 2018. P. 119-130.

- 7 Satish D. et al. Prescription Practices of Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in a Public Health System // Gastroenterology. 2017. V. 152. №. 5. P. S680-S681.

- 8 Збарский, Б.И., Збарский, И.Б., Солнцев А.И. Практикум по биологической химии. М: Государственное изд-во медицинской литературы МЕДГИЗ, 1954. 348 с.

- 9 Функциональная гастроэнтерология. Панкреатическая липаза. 2015. Т. 9. № 2. С. 23–27. URL: <http://www.gastroscan.ru/handbook/120/509>

REFERENCES

- 1 Upravlenie Federal'noi sluzhby po nadzory v sfere zashchity [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare in the Voronezh Region. On the control of the quality and safety of milk and dairy products] 2017. no. 2. Available at: <http://36.rospotrebnadzor.ru/news/18637>. (in Russian)
- 2 Issledovaniya i analitika greengu.ru [Research and analysis greengu.ru. Palm oil: cheap and harmful] 2017. no. 5. Available at: <http://greengu.ru/palmoveo-maslo-deshevo-i-vredno>. (in Russian)
- 3 Bowen-Forbes C. S., Goldson-Barnaby A. Fats. Pharmacognosy. 2017. pp. 425-441.
- 4 Deelstra H., Burns D. T., Walker M. J. The adulteration of food, lessons from the past, with reference to butter, margarine and fraud. European Food Research and Technology. 2014. vol. 239. no. 5. pp. 725-744

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алла В. Никулина к.х.н., кафедра физической и аналитической химии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, nik_a_68@mail.ru

Татьяна И. Парыгина студент, кафедра физической и аналитической химии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, parygina.tatyana2014@yandex.ru

Татьяна А. Кучменко д.х.н., профессор, кафедра физической и аналитической химии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, tak1907@mail.ru

КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА

Алла В. Никулина обзор литературных источников по исследуемой проблеме, консультация в ходе исследования

Татьяна И. Парыгина провела эксперимент, написала рукопись, корректировала её до подачи в редакцию и несёт ответственность за плагиат

Татьяна А. Кучменко консультация в ходе исследования

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ПОСТУПИЛА 22.12.2017

ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 02.02.2018

5 Nurrulhidayah A. F. et al. Authentication analysis of butter from beef fat using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics. International Food Research Journal. 2013. vol. 20. no. 3.

6 Zaharudin N. A. et al. Enzymatic Hydrolysis of Used Cooking Oil Using Immobilized Lipase. Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes. Springer, Singapore, 2018. pp. 119-130.

7 Satish D. et al. Prescription Practices of Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in a Public Health System. Gastroenterology. 2017. vol. 152. no. 5. pp. S680-S681.

8 Zbarsky B.I., Zbarsky I.B., Solntsev A.I. Praktikum po biologicheskoi khimii [Workshop on Biological Chemistry] Moscow, MEDGIZ, 1954. 348 p. (in Russian)

9 Functional gastroenterology. *Pankreaticheskaya lipaza* [Pancreatic lipase] 2015. vol. 9. no. 2. pp. 23-27. Available at: <http://www.gastroscan.com/handbook/120/509>

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Alla V. Nikulina and. Sci. (Chem.), physical and analytical chemistry department, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, nik_a_68@mail.ru

Tat'yana I. Parygina student, physical and analytical chemistry department, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, parygina.tatyana2014@yandex.ru

Tat'yana A. Kuchmenko Dr. Sci. (Chem.), professor, physical and analytical chemistry department, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, tak1907@mail.ru

CONTRIBUTION

Alla V. Nikulina review of the literature on an investigated problem, consultation during the study

Tat'yana I. Parygina conducted an experiment, wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Tat'yana A. Kuchmenko consultation during the study

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

RECEIVED 12.22.2017

ACCEPTED 2.2.2018