

О. В. Колоскова, О. К. Никулина, М. Р. Яковлева

*РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»,
Минск, Республика Беларусь*

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ДИФфуЗИОННОМ СОКЕ

Аннотация. Одним из важнейших факторов, влияющих на качество диффузионного сока и потери сахарозы, является развитие микрофлоры в процессе получения диффузионного сока. В связи с этим важное значение имеет оперативный контроль за микробиологической зараженностью соко-стружечной смеси в диффузионном аппарате. Молочная кислота является индикатором степени микробиологической зараженности диффузионного сока. Традиционно при расчете неучтенных потерь сахарозы на диффузии для определения концентрации молочной кислоты используется титриметрический метод с предварительным выделением анионов кислот из диффузионного сока на ионитных колонках. Однако данный метод является длительным и трудозатратным и не подходит для оперативного контроля. В статье предлагается использовать с этой целью более простой и менее длительный спектрофотометрический метод, основанный на измерении оптической плотности окрашенного продукта реакции лактат-ионов с хлоридом железа(III) при длине волны 400 нм. В статье приведены результаты оценки согласованности данных по содержанию молочной кислоты в диффузионных соках, полученных при помощи титриметрического и спектрофотометрического методов. Результаты анализа данных при помощи метода описательной статистики Блэнда-Алтмана подтверждают, что данные, полученные различными способами, хорошо согласуются друг с другом, и следовательно, спектрофотометрический метод определения концентрации лактат-ионов может использоваться в производственном контроле в сахарной промышленности.

Ключевые слова: сахарное производство, контроль качества диффузионного сока, определение содержания молочной кислоты, спектрофотометрический метод анализа, титриметрический метод анализа, оценка согласованности результатов, метод Блэнда-Алтмана

O. V. Koloskova, O. K. Nikulina, M. R. Yakovleva

*RUE “Scientific and Practical Centre for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus*

ESTIMATION OF THE SUITABILITY OF METHODS FOR DETERMINING LACTIC ACID CONTENT IN DIFFUSION JUICE FOR APPLICATION IN CHEMICAL AND TECHNICAL CONTROL OF SUGAR PRODUCTION

Abstract. Development of microbiological infection in the process of production of diffusion juice is one of the most important factors affecting the quality of diffusion juice and sucrose loss. In this regard, it is important to promptly monitor the microbiological contamination of mixture from water and beet chips in the diffusion apparatus. Lactic acid is used as an indicator of the degree of microbiological contamination of the diffusion juice. Traditionally, when calculating unaccounted sucrose losses on diffusion, the titrimetric method is used to determine the concentration of lactic acid with preliminary isolation of acid anions from the diffusion juice on ionite columns. However, this method is time-consuming and labor-intensive and is not suitable for operational control. The article suggests using a simpler and less time-consuming spectrophotometric method for operational control, based on measuring the optical density of the colored product of the reaction of lactate ions with iron(III) chloride at a wavelength 400 nm. The results of evaluating the consistency of data on the content of lactic acid in diffusion juices obtained using the traditional and spectrophotometric methods are presented in article. The results of data analysis using the Bland-Altman descriptive statistics method confirm that the data obtained by various methods are in good agreement with each other, and therefore the spectrophotometric method for determining the concentration of lactate ions can be used in production control in the sugar industry.

Key words: sugar production, quality control of diffusion juice, determination of lactic acid content, spectrophotometric method of analysis, titrimetric method of analysis, evaluation of the consistency of results, Bland-Altman's method

Введение. Извлечение сахара из свекловичной стружки путем диффузии один из важнейших технологических процессов сахарного производства. От него зависят потери сахара в жоме и диффузионной установке, качество получаемого диффузионного сока, а в конечном итоге выход и качество готовой продукции.

Одним из важнейших факторов, влияющих на качество диффузионного сока и потери сахарозы, является развитие микрофлоры в процессе его получения. Оперативный контроль за уровнем микробиологической зараженности сокостружечной смеси в диффузионном аппарате позволяет своевременно принять меры для предотвращения развития инфекции и рационально использовать антимикробные препараты.

Используемый на производстве контроль за рН диффузионного сока оказывается недостаточным. Это связано с тем, что место наибольшего снижения рН в диффузионном аппарате не соответствует месту наибольшего развития микроорганизмов, хотя максимум живых и мертвых клеток бактерий обычно совпадает с минимальным значением рН [1-3].

Большая часть микроорганизмов, развивающихся в диффузионном соке, превращает сахарозу в органические кислоты, среди которых преобладает молочная кислота. В связи с этим уровень содержания молочной кислоты используют как индикатор степени микробиологической зараженности диффузионного сока [4–7].

Традиционно при расчете неучтенных потерь сахарозы на диффузии для определения концентрации молочной кислоты используется метод, описанный в «Инструкции по химико-техническому учету и контролю свеклосахарного производства», который включает в себя пропускание раствора диффузионного сока через ионитные колонки, заполненные катионитом КУ-2, с последующим титрованием 0,1 н. NaOH. В колонках осуществляется количественное превращение солей в кислоты. Выделение из катионита кислоты производится дистиллированной водой. На проведение анализа требуется более 1 часа. Из-за своей длительности и трудоемкости данный метод не очень подходит для оперативного контроля, что делает актуальным поиск альтернативных методов [8].

Следует отметить, что в настоящее время разработаны ферментативные методы для определения молочной кислоты. Выпускаются тест-системы для определения молочной кислоты ферментативным способом в продуктах питания и биологических материалах.

В основе ферментативного анализа лежат природные биохимические процессы обмена веществ, которые воспроизводятся *in vitro*: реакция фермента с субстратом, причем в качестве субстрата выступает анализируемое вещество пробы, в данном случае молочная кислота.

В большинстве ферментативных определений используют фотометрические способы измерения результатов. Для этого все компоненты искусственной тестовой системы (буфер, коферменты, активаторы, вспомогательные ферменты) и пробу смешивают в фотометрической кювете. После измерения начальной оптической плотности добавляют стартовый фермент, который инициирует реакцию. Через определенный промежуток времени повторно измеряют оптическую плотность тестовой системы. Из разницы оптических плотностей в начале и в конце реакции по уравнению закона Ламберта-Бера рассчитывают концентрацию искомого соединения [9].

Не смотря на свою высокую точность, данный метод не нашел широкого распространения в производственном контроле. Это связано с тем, что тест-системы для определения D- и L-молочной кислоты ферментативным методом отличаются высокой стоимостью.

Анализ литературных источников показал, что наиболее перспективным для использования в химико-техническом контроле сахарного производства является спектрофотометрический метод определения концентрации молочной кислоты, основанный на измерении оптической плотности окрашенного продукта реакции лактат-ионов с хлоридом железа(III) при длине волны 400 нм [10]. Продолжительность определения концентрации молочной кислоты спектрофотометрическим методом составляет около 20 минут.

Для того, чтобы оценить возможность использования данного метода в производственном контроле и оценить согласованность данных по содержанию молочной кислоты в диффузионных соках, полученных традиционным титриметрическим и спектрофотометрическим методами, в лаборатории РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» были проведены исследования.

Организация и методы исследований. Диффузионный сок для исследований получали в лабораторных условиях. Свеклу нарезают на равные брусочки толщиной и шириной 0,4–0,5 см и длиной около 1,5 см. В полученную стружку добавляли воду в соотношении 1:1,2. Полученные смеси ставили на водяную баню при температуре 75–80 °С и выдерживали в течение 50 минут, периодически

перемешивая. Жидкую фракцию сливали и получали диффузионный сок. Таким способом было приготовлено 6 образцов диффузионного сока.

В образцах сока определяли следующие качественные показатели: содержание сахарозы, содержание сухих веществ, чистоту в соответствии с «Инструкцией по химико-техническому контролю и учету сахарного производства» [8] и pH.

В диффузионных соках определяли молочную кислоту традиционным и спектрофотометрическим методами, описанными в [8] и [9] соответственно. Концентрацию молочной кислоты определяли также и в свекловичном соке, что позволило рассчитать ориентировочные потери сахарозы вследствие микробиологического разложения.

Для сравнения данных по содержанию молочной кислоты в диффузионном соке, полученные разными методами, использовали описательный метод статистики, предложенный Д. Блэндом и Дж. Алтманом.

Построение диаграммы Блэнда-Алтмана и расчет статистических показателей проводили при помощи программы STATISTICA 10.

Результаты исследований и их обсуждения. В табл. 1 представлены показатели качества исследованных образцов диффузионного сока.

Таблица 1. Показатели качества диффузионного сока
Table 1. Indicators of the quality of the diffusion juice

Номер образца	Показатели				
	pH	Содержание сухих веществ, %	Содержание сахарозы, %	Чистота, %	Общие сахара, % к массе свеклы
1	6,3	11,69	10,55	90,25	1,37
2	6,3	12,11	10,66	88,03	1,74
3	6,2	12,05	10,68	88,63	1,64
4	6,4	11,22	10,11	90,10	1,33
5	6,3	12,44	10,86	87,31	1,9
6	6,3	12,16	11,01	90,54	1,38

Анализ представленных данных показывает, что полученные образцы диффузионного сока по исследованным показателям соответствуют диффузионному соку хорошего качества по классификации Вукова: чистота выше 88 %, содержание общих сахаров — менее 2 % к массе свеклы [10].

Содержание молочной кислоты в исследованных диффузионных соках составляло менее 0,05 % к массе сока (табл. 2). Согласно данным научно-технической литературы, при содержании молочной кислоты в количестве 0,02–0,05 % к массе диффузионного сока степень контаминации может рассматриваться как низкая. При этом количество микроорганизмов составляет 10^2 – 10^4 в 1 см³ сока.

На основании прироста молочной кислоты в диффузионном соке относительно свекловичного сока рассчитаны ориентировочные потери сахарозы от деятельности микроорганизмов (табл. 2). При этом учитывалось, что коэффициент пересчета от молочной кислоты к сахарозе равен 2.

С целью оценки согласованности данных по содержанию молочной кислоты, полученных различными методами анализа, использовали метод описательной статистики Блэнда-Алтмана. Это метод оценки согласованности измерений, выполненных разными способами: для каждой пары показателей, полученных различными способами, вычисляется разность, далее определяется средняя величина и стандартное отклонение разности. Средняя разность характеризует систематическое расхождение, а стандартное отклонение — степень разброса результатов [11].

Данные, использовавшиеся для построения диаграммы и расчета статистических показателей, приведены в табл. 3, диаграмма Блэнда-Алтмана на рис. 1.

Диаграмма Блэнда-Алтмана представляет собой диаграмму рассеяния, по оси X которой откладывается среднее значение для двух методов в одном испытании, а по Y — разность значений в одном испытании. Также на графике проводятся две линии, соответствующие средней разности плюс/минус $1,96 \cdot$ стандартное отклонение, что обозначает ожидаемый разброс разностей значений двух измерений.

Анализ диаграммы, представленной на рис. 1, показывает, что 95 % значений разницы показателей при парных измерениях попадают в интервал $\pm 1,96 \cdot$ стандартное отклонение. Средняя разность между измерениями равна всего лишь 0,001, что говорит об отсутствии систематического расхождения. Стандартное отклонение разностей составило 0,00055, что невелико по сравнению с самими значениями. Отсутствует зависимость разности измерений от величины изменения концентрации молочной кислоты. Все это говорит о том, что значения показателя изменения концентрации молочной кислоты, полученные при помощи различных методик, хорошо согласуются друг с другом.

Таблица 2. Содержание молочной кислоты в диффузионных соках и ориентировочные потери сахарозы на диффузии
Table 2. The content of lactic acid in the diffusion juice and the estimated loss of sucrose on the diffusion

Номер / наименование образца	Содержание молочной кислоты, % к массе сока / % к массе свеклы	Прирост молочной кислоты, % к массе свеклы	Потери сахарозы от жизнедеятельности микроорганизмов, % к массе свеклы
Данные, полученные при использовании титриметрического метода определения концентрации молочной кислоты			
Свекловичный сок	0,0420 / 0,0382	–	–
Диффузионные соки			
1	0,0461 / 0,0507	0,0125	0,0250
2	0,0502 / 0,0552	0,0170	0,0340
3	0,0452 / 0,0497	0,0115	0,0230
4	0,0530 / 0,0583	0,0201	0,0402
5	0,0487 / 0,0536	0,0154	0,0308
6	0,0386 / 0,0425	0,0043	0,0086
Данные полученные при использовании спектрофотометрического метода определения концентрации молочной кислоты			
Свекловичный сок	0,0368/0,0335	–	–
Диффузионные соки			
1	0,0413 / 0,0454	0,0119	0,0238
2	0,0441 / 0,0485	0,0150	0,0300
3	0,0402 / 0,044	0,0105	0,0210
4	0,0478 / 0,0526	0,0191	0,0382
5	0,0432 / 0,0475	0,0140	0,0280
6	0,0379 / 0,0417	0,0038	0,0076

Таблица 3. Данные для расчета статистических показателей и построения диаграммы Блэнда-Алтмана
Table 3. Data for calculating statistical indicators and building a Bland-Altman diagram

Результаты определения прироста концентрации молочной кислоты, % к массе свеклы		Разность	Среднее значение
Методом титрования	Спектрофотометрическим методом		
0,0125	0,0119	-0,0006	0,0122
0,0170	0,0150	-0,002	0,016
0,0115	0,0105	-0,001	0,011
0,0201	0,0191	-0,001	0,0196
0,0154	0,0140	-0,0014	0,0147
0,0043	0,0038	-0,0005	0,00405

Заключение. На основании выше изложенного можно сделать вывод, что более простой и быстрый спектрофотометрический метод определения концентрации молочной кислоты может использоваться в производственном контроле, в частности для оценки микробиологической зараженности диффузионного сока и расчета ориентировочных потерь сахарозы на диффузии.

Список использованных источников

1. Сапронов, А.Р. Технология сахарного производства / А.Р. Сапронов. — Москва : Колос, 1999, 494 с.
2. Бугаенко, И.Ф. Повышение эффективности сахарного производства. — Часть II: Извлечение сахара из стружки / И.Ф. Бугаенко. — Москва. — 2000. — 70 с.
3. Бугаенко, И.Ф. Общая технология отрасли: Научные основы технологии сахара: Учебник для студентов вузов. — Ч.1 / И.Ф. Бугаенко, В. И. Тужилкин. — СПб: ГИОРД, 2007. — 512 с.
4. Бугаенко, И.Ф. Принципы эффективного сахарного производства / И. Ф. Бугаенко. — Москва : ООО «Инмашпроект», 2003. — 285 с.

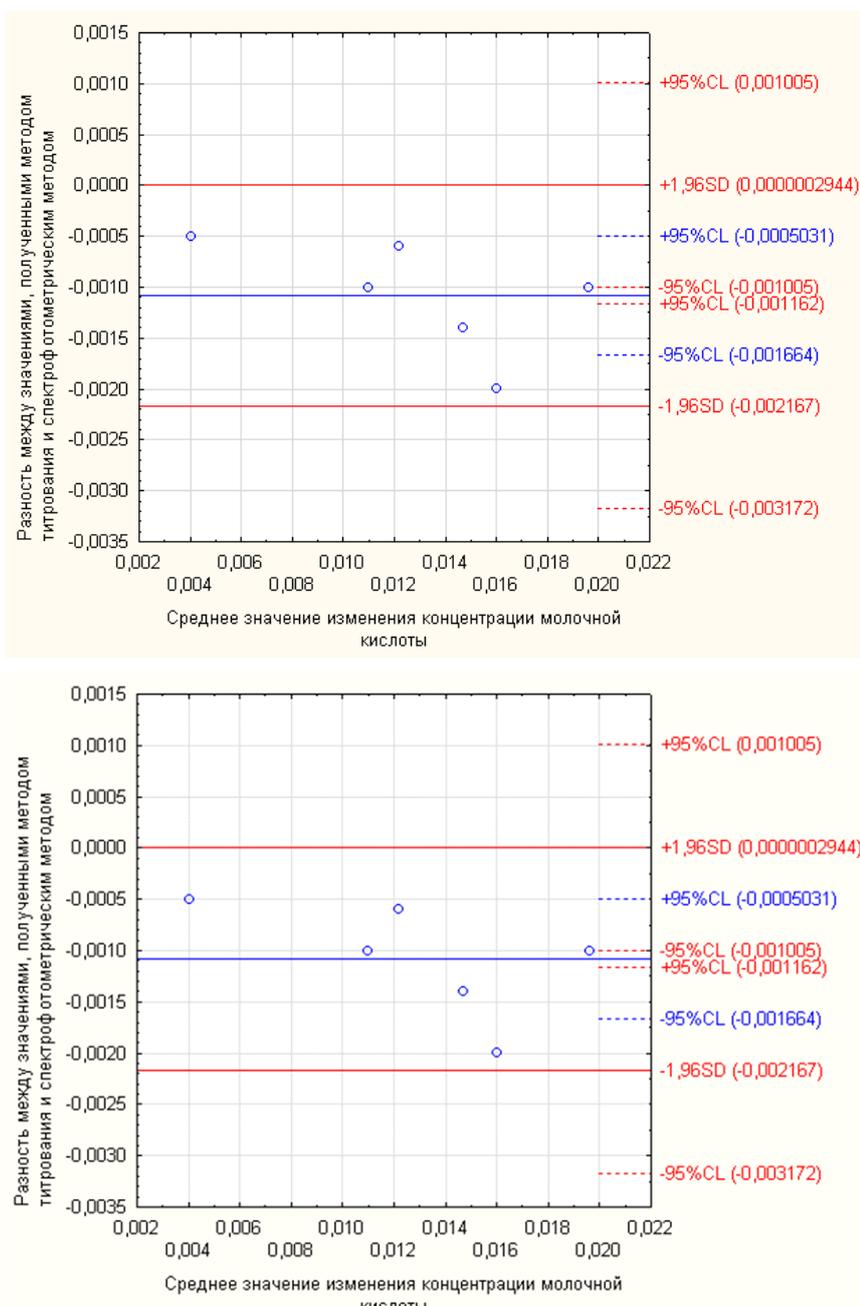


Рис. 1. Диаграмма Блэнда-Алтмана
Fig. 1. Bland-Altman diagram

5. Даишев, М.И. Теоретические основы технологии сахара. — Ч. 1: Технология получения диффузионного сока (современное состояние и перспективы развития) / Краснодар : Куб ГТУ, 1997. — 68 с.
6. Силин, П.М. Технология сахара / П.М. Силин. — Москва : Пищевая промышленность, 1967. — 625 с.
7. Бугаенко, И.Ф. Основы сахарного производства / И.Ф. Бугаенко. — Москва, ЗАО «Международная сахарная компания», 2002 — 355 с.
8. Инструкция по химико-техническому контролю и учету сахарного производства. — Киев, 1983. — 476 с.
9. Березовская, В.А. Биохимия. Лабораторный практикум для студентов направления 552400 «Технология продуктов питания» и специальности 271000 «Технология рыбы и рыбных продуктов»: Учебное пособие / В.А. Березовская. — Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2005. — 83 с.
10. Сборник методик определения эффективности процессов в сахарном производстве. — Минск, РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию». — 2014. — 128 с.

- 11 Сравнение двух способов измерения: метод Блэнда-Алтмана [Электронный ресурс]. — 2020. — Режим доступа: <http://statistica.ru/local-portals/medicine/sravnienie-dvukh-sposobov-izmereniya-metod-blenda-altmana>. — Дата доступа : 11.11.2020 г.

References

1. Sapronov, A.R. Tekhnologiya sakharnogo proizvodstva [Sugar production technology] / A.R. Sapronov.— Moscow, Kolos, 1999, 494 p.
2. Bugayenko, I.F. Povysheniye effektivnosti sakharnogo proizvodstva. — Chast' II : Iz-vlecheniya sakhara iz struzhki [Improving the efficiency of sugar production. Part II Extraction of sugar from chips] / I. F. Bugayenko. — Moscow.— 2000.— 70 p.
3. Bugayenko, I.F. Obshchaya tekhnologiya otrasli: Nauchnyye osnovy tekhnologiy sakhara: Uchebnik dlya studentov vuzov [General industry technology: Scientific foundations of sugar technology: Textbook for university students] / V.I. Tuzhilkin, I. F. Bugayenko. — CH.1.— SPb : GIORD, 2007.— 512 p.
4. Bugayenko, I.F. Printsipy effektivnogo sakharnogo proizvodstva [General industry technology: Scientific foundations of sugar technology: Textbook for university students]. — Moscow : OOO «Inmashproyekt», 2003.— 285 p.
5. Daishev, M.I. Teoreticheskiye osnovy tekhnologii sakhara. — CH. 1 : Tekhnologiya polu-cheniya diffuzionnogo soka (sovremennoye sostoyaniye i perspektivy razvitiya) [Theoretical foundations of sugar technology. Part 1. The technology of obtaining diffusion juice (current status and development prospects)] / M. I. Daishev. — Krasnodar: KubGTU, 1997. — 68 p.
6. Silin, P.M. Tekhnologiya sakhara [Technology of sugar] / P.M. Silin. - Moscow: Pishchevaya promyshlennost', 1967 — 625 p.
7. Bugayenko, I.F. Osnovy sakharnogo proizvodstva [Fundamentals of sugar production] / I.F. Bugayenko. — Moscow : ZAO «Mezhdunarodnaya sakharnaya kompaniya», 2002. — 355 p.
8. Instruktziya po khimiko-tekhnicheskomu kontrolyu i uchetu sakharnogo proizvodstva [Instructions for chemical and technical control and accounting of sugar production]. — Kiyev, 1983. — 476 p.
9. Berezovskaya, V.A. Biokhimiya. Laboratornyy praktikum dlya studentov napravleniya 552400 «Tekhnologiya produktov pitaniya» i spetsial'nosti 271000 «Tekhnologiya ryby i rybnykh produktov» [Biochemistry. Laboratory workshop for students of direction 552400 “Food technology” and specialty 271000 “Technology of fish and fish products”]: Uchebnoye posobiye. / V.A. Berezovskaya. — Petropavlovsk-Kamchatskiy: KamchatGTU, 2005. — 83 p.
10. Sbornik metodik opredeleniya effektivnosti protsessov v sakharnom proizvodstve [Collection of methods for determining the efficiency of processes in sugar production]. — Minsk, RUE “Scientific and Practical Centre for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus”, 2014. — 128 p.
11. Sravnieniye dvukh sposobov izmereniya: metod Blenda-Altmana [Comparison of two methods of measurement: Bland-Altman method] [Electronic resource]. — Mode of access: <http://statistica.ru/local-portals/medicine/sravnienie-dvukh-sposobov-izmereniya-metod-blenda-altmana>. — Date of access 11.11.2020 г.

Информация об авторах

Колоскова Ольга Владимировна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sugar@belproduct.by.

Никулина Оксана Константиновна — заведующая научно-исследовательской лабораторией сахарного производства, РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sugar@belproduct.by.

Яковлева Мария Романовна — инженер-технолог, РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (ул. Козлова 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sugar@belproduct.by.

Information about authors

Koloskova Olga V. — Ph.D. (Engineering), Scientific-Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, (29 Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sugar@belproduct.by.

Nikulina Oksana K. — Scientific-Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, (29 Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sugar@belproduct.by.

Yakovleva Maria R. - Scientific-Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, (29 Kozlova str., 220037, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sugar@belproduct.by.