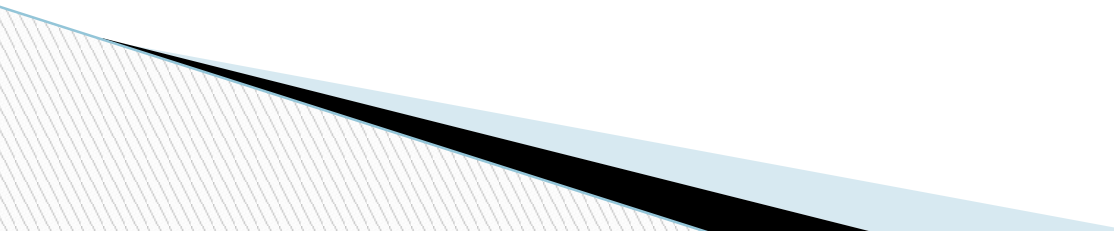


Методы определения белка в тканях животных без минерализации пробы

Выполнила: Хорошавина Юлия, ТМ-41



ЦЕЛЬ: изучить фотометрические методы определения общего белка в мясе убойных животных без предварительной минерализации проб.

- ▣ Определение массовой доли белка методом Лоури;
 - ▣ Определение массовой доли белка биуретовым методом;
 - ▣ Определение массовой доли белка методами, основанными на связывании красителей;
 - ▣ Определение массовой доли белка методами УФ-спектрофотометрии.
- 

Подготовка проб к анализу:

- При определении массовой доли белка в образцах мышечной ткани, *методом Лоури, биуретовым методом или методом, основанным на связывании красителей белками*, образец предварительно тщательно измельчают сначала ножом на часовом стекле или на мясорубке, а затем на гомогенизаторе.
- Для приготовления *щелочного экстракта* 15 г гомонизированного образца взвешивают в колбе Эрленмейера вместимостью 100 см³, прибавляют 20 см³ дистиллированной воды и 10 см³ раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 1 моль/дм³. С помощью воды суспензию переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и хранят 12 ч в холодильнике. После этого 75 см³ экстракта (из верхней части колбы) фильтруют через бумажный фильтр диаметром 15 см, удаляя первые 15 см³ фильтрата.
- При определении массовой доли белка в образцах мышечной ткани *убойных животных методами УФ-спектрофотометрии* образцы предварительно тщательно измельчают сначала ножом на часовом стекле или на мясорубке, а затем на гомогенизаторе.

1 Определение массовой доли белка методом Лоури

1.1 Метод Лоури в модификации Дэвени и Гергей (1976 г)

- ▣ **Приготовление реактивов.**
- ▣ *Реактив А:* раствор Na_2CO_3 массовой долей 2% в растворе NaOH молярной концентрацией 0,1 моль/дм³.
- ▣ *Реактив В:* раствор $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ массовой долей 0,5% в растворе тартрата натрия с массовой долей 1%.
- ▣ *Реактив С:* получают смешиванием 60 см³ реактива А и 1 см³ реактива В (готовят непосредственно перед определением).
- ▣ *Реактив Д:* непосредственно перед использованием реактив Фолина - Чокалтеу титруют по фенолфталеину раствором гидроксида натрия известной молярной концентрации и по полученным результатам разбавляют до концентрации раствора 1 моль/дм³.

1.1 Метод Лоури в модификации Дэвени и Гергей (1976 г)

- ▣ **Порядок проведения анализа.**
- ▣ К $0,2 \text{ см}^3$ исследуемого раствора, содержащего 5-100 мкг белка, прибавляют 1 см^3 реактива С, смешивают и через 10 мин быстро вносят $0,1 \text{ см}^3$ реактива Д, встряхивают и оставляют при температуре $20 \pm 5^\circ \text{C}$ на 30 мин, а затем снимают показания на спектрофотометре при длине волны 750 нм.



1.1 Метод Лоури в модификации Дэвени и Гергей (1976 г)

- ▣ Построение калибровочного графика.
- ▣ Содержание белка в растворе определяют по калибровочному графику, который строят с использованием раствора тирозина известной концентрации. Для приготовления стандартного раствора 20 мг кристаллического тирозина растворяют в 200 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,2 моль/дм³. Калибровочный график строят, используя растворы тирозина с рекомендуемой массовой концентрацией:

| Содержание тирозина, мкг | Объем р-ра тирозина, см ³ | Объем р-ра HCl конц. 0,2 моль/дм ³ , см ³ | Значение экстинкции |
|--------------------------|--------------------------------------|---|---------------------|
| 10 | 0,1 | 0,9 | 0,113 |
| 20 | 0,2 | 0,8 | 0,208 |
| 30 | 0,3 | 0,7 | 0,316 |
| 40 | 0,4 | 0,6 | 0,401 |
| 50 | 0,5 | 0,5 | 0,511 |
| 60 | 0,6 | 0,4 | 0,614 |
| 70 | 0,7 | 0,3 | 0,706 |
| 80 | 0,8 | 0,2 | 0,817 |
| 90 | 0,9 | 0,1 | 0,900 |

1.1 Метод Лоури в модификации Дэвени и Гергей (1976 г)

- По результатам определения строят калибровочный график (рис.1), откладывая на оси абсцисс концентрацию стандартных растворов ($\text{мкг}/\text{см}^3$) тирозина, а на оси ординат – значения оптической плотности при 750 нм. По графику находят концентрацию тирозина, которая соответствует найденной оптической плотности.

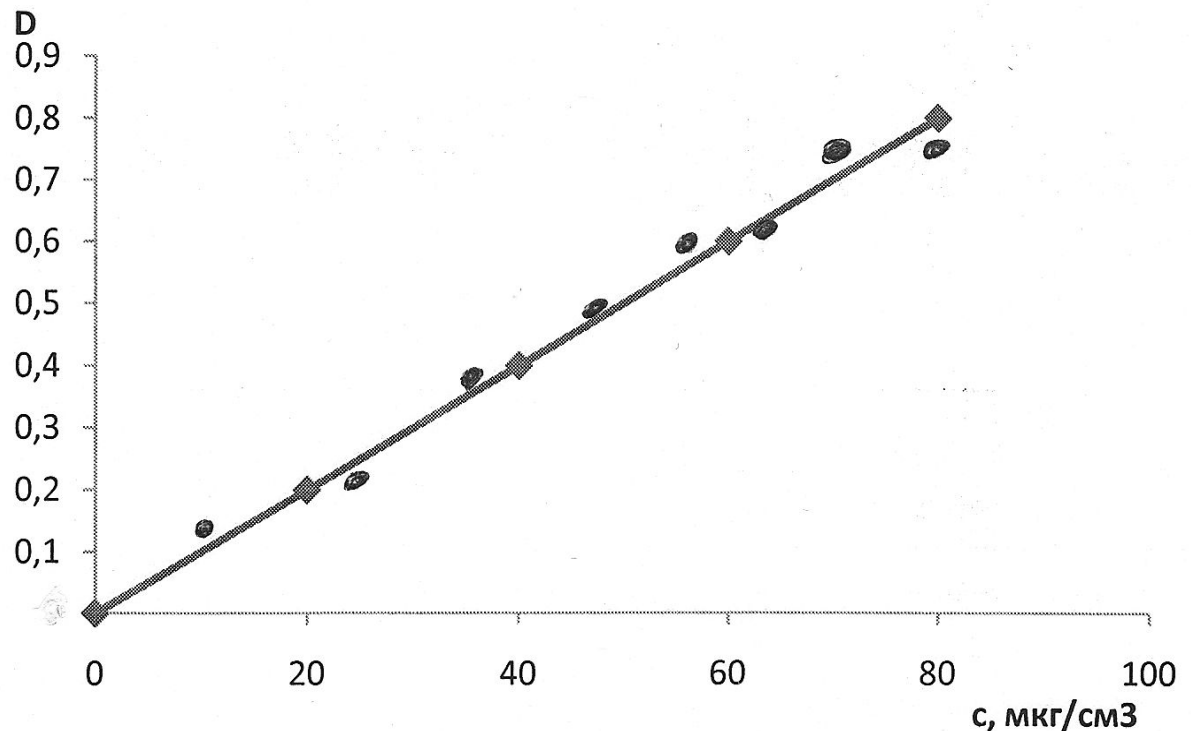


Рисунок 1 –
Калибровочный график для
определения белка по методу
Лоури в модификации
Дэвени-Гергей.

1.2 Метод Лоури в модификации Ластыть (1978 г)

▣ Приготовление реактивов.

▣ *Реактив А:* смесь растворов: Na_2CO_3 молярной концентрацией 1 моль/дм³, NaOH молярной концентрацией 1 моль/дм³ и CuSO_4 с массовой долей 0,5% (содержит 1% тартрата калия-натрия)⁴ в соотношении 10:5:1.

▣ Порядок проведения анализа.

▣ В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 2-5 см³ щелочного экстракта белков образца, приготовленного в соответствии с прописью подготовки проб, прибавляют 15 см³ раствора тартрата калия-натрия молярной концентрацией 1 моль/дм³ и доводят объем дистиллированной водой до метки. В зависимости от массового содержания азота для фотометрического определения используют 0,2 см³ приготовленного раствора. Объем доводят до 10 см³ с помощью реактива А. По истечении 30 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 750 нм. Для определения содержания азота строят калибровочный график.

2. Определение массовой доли белка биуретовым методом

- ▣ **Приготовление реактивов.**
- ▣ Биуретовый реактив: 0,9 г тартрата калия-натрия, 3 г сульфата меди и 0,5 г иодида калия растворяют в 1000 см³ раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,2 моль/дм³.
- ▣ **Порядок проведения анализа.**
- ▣ Щелочной экстракт белков объемом 2 см³ смешивают с 15 см³ биуретового реактива. После 30 мин инкубирования смеси при 37° С светопоглощение измеряют на спектрофотометре при длине волны 550 нм.
- ▣ Контрольный метод готовят аналогично, используя вместо образца 1 см³ дистиллированной воды.

2. Определение массовой доли белка биуретовым методом

- Построение калибровочного графика.
- Для построения графика готовят ряд последовательных разведений стандартного раствора белка, в качестве которого используют кристаллический сывороточный альбумин: 0,01 г белка растворяют в 100 см³ дистиллированной воды, отбирают 1 см³ и доводят объем до 10 см³.
- С пробами из каждого разведения белка проводят биуретовую реакцию в условиях, соответствующих описанию метода, и измеряют оптическую плотность окрашенных растворов. Затем строят график $D=f(c)$, пример которого приведен на рисунке 2.

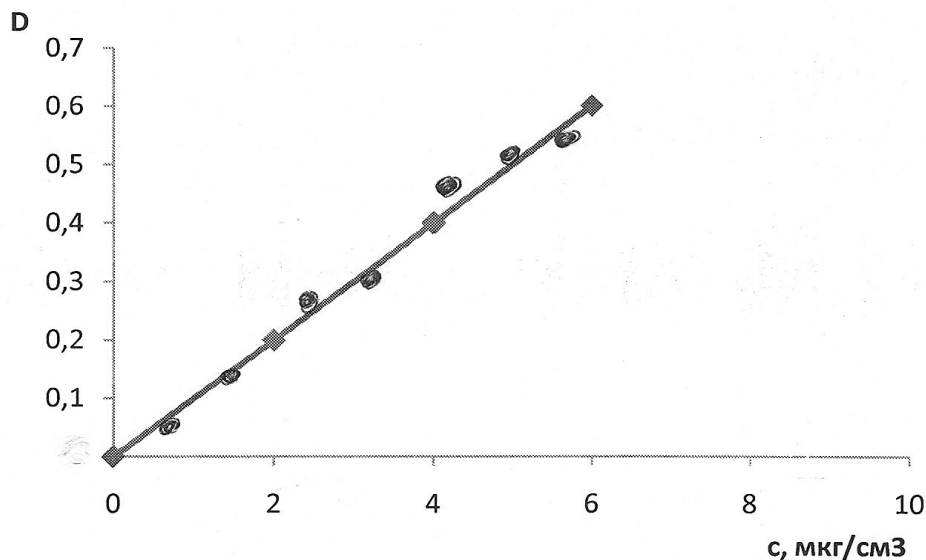


Рисунок 2 – Калибровочный график для определения белка биуретовым методом.

3. Определение массовой доли белка методами, основанными на связывании красителей

3.1 Метод с использованием амидочерного 10В

- ▣ **Приготовления реактивов.**
- ▣ Раствор красителя амидочерного 10В: 0,6 г амидочерного 10В, 21 г лимонной кислоты и 2,5 см³ пропионовой кислоты растворяют в 1000 см³ дистиллированной воды.
- ▣ **Порядок проведения анализа.**
- ▣ Смешивают 2 см³ щелочного экстракта, содержащего мясные белки, с 25 см³ раствора красителя амидочерного 10В.
- ▣ После проведения цветной реакции в течение 1 ч раствор центрифугируют в течении 10 мин при 100 с⁻¹. Абсорбцию прозрачного супернатанта определяют на спектрофотометре при длине волны 615 нм. Массовую долю белка определяют по калибровочному графику.

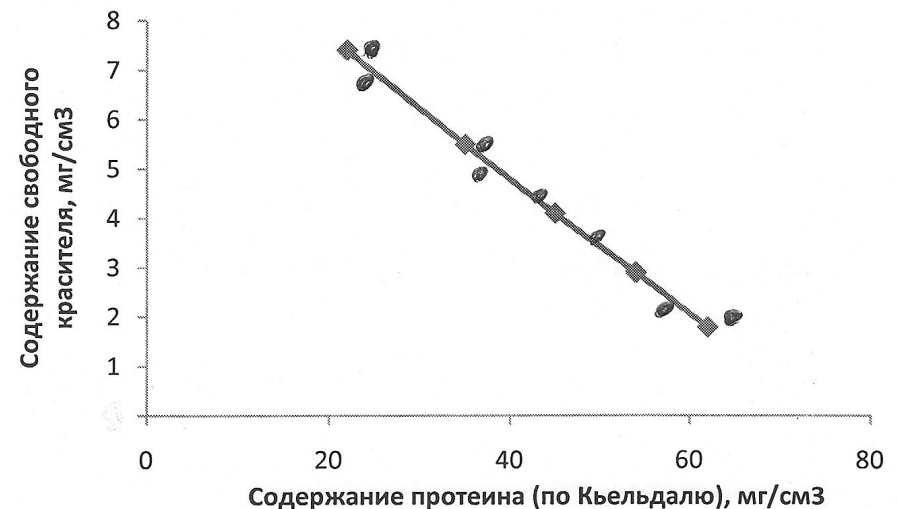
3.2 Метод с использованием оранжевого кислого 12

- ▣ **Приготовления реактивов.**
- ▣ Раствор красителя оранжевого кислого 12: 1,3 г очищенного красителя растворяют в фосфатном буфере молярной концентрацией 0,05 моль/дм³ и доводят объем до 1 дм³.
- ▣ *Фосфатный буфер молярной концентрацией 0,05 моль/дм³ (pH= 1,8-1,9):* 3,4 г KH_2PO_4 , 3,4 см³ H_3PO_4 (массовой долей 85%), 60 см³ уксусной кислоты, 1 см³ пропионовой кислоты и 2 г щавелевой кислоты растворяют в 800 см³ H_2O и затем доводят водой до 1 дм³. Щавелевую кислоту и KH_2PO_4 предварительно растворяют отдельно в горячей воде.

3.2 Метод с использованием оранжевого кислого 12

- **Порядок проведения анализа.**
- К навеске пробы, содержащей около 4 г белка, добавляют из мерной колбы 250 см³ раствора лимонной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³ и гомогенизируют в течение 2-3 мин.
- Взвешивают 2-4 г разбавленного образца с точностью до 0,01 г в пробирки 50 мл, добавляют воду до 5 г, а затем 25 см³ раствора красителя, закрывают пробкой и энергично встряхивают. Оставляют на 30 мин для взаимодействия красителя с белком и агрегации образовавшихся комплексов. Если смесь мутная, то ее центрифугируют и фильтруют. Определяют концентрацию свободного несвязавшегося красителя, измеряя абсорбцию при длине волны 475 нм. Для расчета используют стандартный график, который строят на основе анализа мяса методом Кьельдаля того же состава, что и анализируемый образец.

Рисунок 3 – отношение содержания свободного красителя к общему содержанию белка в образце свиной колбасы, определенному по методу связывания красителя.



4. Определение массовой доли белка методами УФ-спектрофотометрии

4.1 Метод определения массовой доли белка в говядине

- **Порядок проведения анализа.**
- Образец массой 15г гомогенизируют с 250 см³ раствора лимонной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/дм³ в гомогенизаторе в течение 2-3 мин, переносят в пробирку.
- В пробирку добавляют 9,5 см³ раствора мочевины молярной концентрацией 8 моль/дм³ в растворе гидроксида натрия молярной концентрацией 2 моль/дм³, встряхивают, центрифугируют при частоте вращения 83 с⁻¹ в течение 7 мин для отделения жира и измеряют оптическую плотность при длине волны 243 нм.
- Массовую долю белка определяют, используя калибровочный график или уравнение регрессии (для чего предварительно определяют массовую долю белка по методу Кьельдаля).
- Уравнение регрессии, например, для соленой говядины имеет вид:

$$y=17,32x+1,025,$$

где y – массовая доля белка, %;

x - оптическая плотность ($x=D$ при длине волны 243 нм)

4.2 Метод определения массовой доли белка в мясе птицы

- **Порядок проведения анализа.**
- Образец массой 1,5 г тщательно измельченный суспендируют в гомогенизаторе в течение 5 мин со 100 см³ раствора лимонной кислоты, затем с помощью пипетки вносят 0,5 см³ суспензии в центрифужную пробирку, добавляют 9,5 см³ раствора карбамида, содержащего гидроксид натрия, и после осторожного перемешивания центрифугируют в течение 3 мин при частоте вращения 116-117 с⁻¹. Заполняют кварцевую кювету с толщиной светопоглощающего слоя 1 см прозрачной жидкостью и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 241 нм.
- В качестве контрольного раствора используют смесь из 0,5 см³ раствора лимонной кислоты молярной концентрацией 0,1 моль/дм³ и 9,5 см³ щелочного раствора мочевины.
- Массовую долю белка определяют, используя калибровочный график или приведенное выше уравнение регрессии. Пробы с различной массовой долей белка рекомендуется готовить путем смешивания гомогенизированного куриного мяса со свиным жиром в различных соотношениях.

4.3 Метод определения массовой доли белка в свинине и говядине

- **Порядок выполнения анализа.**
- Анализ проводится по той же методике (см. п. 4,2), но с использованием других длин волн и других калибровочных графиков. Возможно также использование уравнений регрессии:

для свинины: $y = -13,7282 + 63,8762x$;

для говядины: $y = 6,9999 + 34,8326x$.

- Результаты определения массовой доли белка в объектах исследования с использованием метода Лоури, биуретового метода и метода связывания красителей белками рекомендуется оформлять в виде таблицы:

| Объект исследования | Оптическая плотность р-ра | Концентрация азота по калибровочному графику, мкг/см ³ | Массовая доля белка, % |
|---------------------|---------------------------|---|------------------------|
| | | | |

- Результаты определения массовой доли белка в объектах исследования с использованием метода УФ-спектрофотометрии рекомендуется свести в таблицу:

| Объект исследования | Оптическая плотность р-ра | Массовая доля белка, % |
|---------------------|---------------------------|------------------------|
| | | |

Заключение:

- По результатам предварительной теоретической подготовки и проведенных определений делают выводы и составляют общее заключение по работе. На базе литературных данных и результатов собственных исследований рекомендуется дать сравнительную характеристику сырья и продуктов по содержанию белка, а также прокомментировать преимущества и недостатки предлагаемых методов анализа белков мяса и мясопродуктов.

Список литературы:

- Антипова Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов.- М.: КолосС, 2004. – 571с.
- Журавская Н.К. исследование и контроль качества мяса и мясопродуктов / Н.К. Журавская, Л.Т. Алехина, Л.М. Отряшенкова. – М.: Агропромиздат, 1985. – 296с.
- Химия пищи. Кн.1: Белки: структура, функции, роль в питании / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Н.И. Дунченко и др. – М.: Колос, 2000. – 384с.

**Спасибо
за внимание!**

