

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра технологии мясных, молочных  
продуктов и химии

**Б1.В.02 СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА КАЧЕСТВА  
КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**

**Лабораторная работа. Определение белков фотометрическими  
способами**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

Направление подготовки  
**19.04.03 Продукты питания животного происхождения**

Квалификация (степень) выпускника  
**магистр**

Уфа 2019

УДК 637.523  
ББК 36.92

Рассмотрена и одобрена на заседании методической комиссии факультета  
Пищевых технологий «28» марта 2019 г. (протокол № 9).

Составитель: доцент А.Р. Салихов

Ответственный за выпуск: зав. кафедрой ТММП и Химии  
д.с.-х. н., проф. Тагиров Х.Х.

г. Уфа, БГАУ, кафедра ТММП и Х

## Лабораторная работа

### I АНАЛИЗ СУММАРНЫХ БЕЛКОВ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ НА ОСНОВЕ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ПРОБ

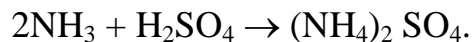
**Цель и задачи работы:** определить массовую долю суммарных белков в образцах органов и тканей убойных животных. В задачи работы входит освоение ускоренного фотометрического метода определения общего белка в мясе и мясопродуктах на основе проведения предварительной минерализации проб и расчет массовой доли общего белка в анализируемых образцах.

#### 1.1 Методические указания

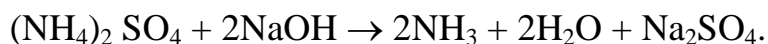
Контроль и оценка качества мяса и мясных изделий по массовой доле белка как при проведении научно-исследовательских работ, так и в условиях производственных лабораторий требует наличия ускоренных, нетрудоемких и достаточно точных методов анализа.

Классическим методом определения массовой доли белков в мясе и мясопродуктах является метод Кьельдаля, предложенный для определения общего азота в различных материалах в 1883 г. Почти за целое столетие его применения появилось много модификаций, во многих из которых сохранились все основные стадии оригинального метода Кьельдаля – минерализация, отделение аммиака дистилляцией и титрование.

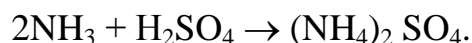
Минерализация проводится нагреванием навески с концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора (ртутно-кадмиевая соль, сульфатная смесь или перекись водорода). Выделившийся аммиак вступает в реакцию с избытком концентрированной серной кислоты с образованием сульфата аммония:



Для выделения аммиака сульфат аммония разлагают концентрированным гидроксидом натрия:



Выделившийся аммиак поглощается титрованными растворами серной кислоты:



Реализация метода осуществляется на специальной установке, представленной на схеме (рисунок 1).

Избыток серной кислоты оттитровывают гидроксидом натрия и по количеству связанной кислоты вычисляют количество поглощенного аммиака или соответствующее ему количество азота.

Используемые на практике методы количественного определения белков основаны на анализе составных частей макромолекул или исследовании некоторых физических свойств их растворов, изменяющихся в прямой зависимости от концентрации.

В связи с этим интерес представляют фотометрические методы определения белков в мясе и мясных продуктах, которые отличаются высокой

чувствительностью и точностью, требуют значительно меньших затрат времени, чем классический метод Кьельдаля. Для фотометрического анализа применяют различные типы фотоэлектроколориметров и спектрофотометров, которые удобны в работе и выпускаются отечественной промышленностью.

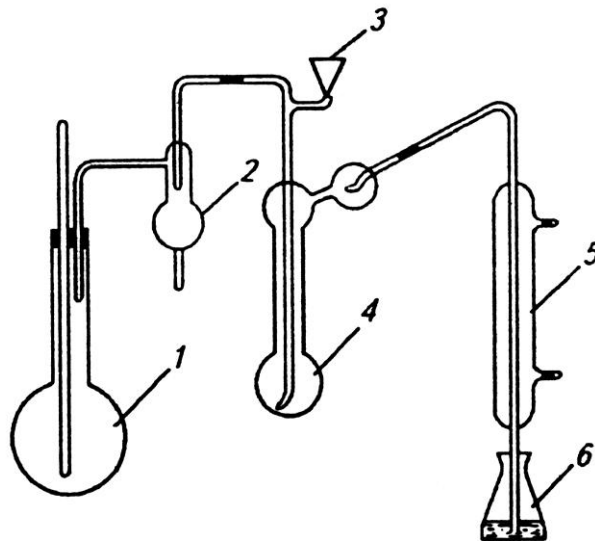


Рисунок 1 Установка для отгонки аммиака: 1 – парообразователь; 2 – каплеуловитель; 3 – воронка; 4 – отгонная колба; 5 – холодильник; 6 – приемная колба

В группе методов определения суммарных белков в животных тканях на основе минерализации проб основное время занимает минерализация пробы, продолжительность которой благодаря подбору эффективных катализаторов составляет 2-2,5 ч. Последующее проведение цветной реакции и фотометрирование не превышают 30-40 мин, при этом одновременно можно анализировать серию проб.

Часто массовую долю белка в тканях и продуктах определяют по массовой доле азота, являющейся характерным показателем элементарного состава белков. Массовая доля азота для многих белков близка к 16 %, поэтому массовое содержание белковых веществ вычисляют, умножая полученную массу азота на коэффициент 6,25, который выводят путем деления:  $100:16 = 6,25$ . Для определения массового содержания белков соединительной ткани пользуются коэффициентом 5,62, принимая во внимание, что массовая доля азота в коллагене 17,8 %. При использовании метода не учитывается небелковый азот продуктов.

**Объекты исследования:** образцы мышечной, соединительной ткани, внутренних органов или кровь убойных животных.

**Материалы, реактивы, оборудование:** серная кислота плотностью 1840 кг/м<sup>3</sup>; раствор соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>; перекись водорода; сульфат аммония; хлорат кальция; гидроксид натрия; фенол; нитропруссид натрия; тиосульфат натрия; гипохлорит или дихлоризоцианурат натрия; йодид калия; карбонат натрия; установка Кьельдаля, фотоэлектроколориметр.

## 1.2 Подготовка проб к анализу

Исследуемые образцы тщательно измельчают (ножом или на мясорубке). В колбу Кьельдаля вместимостью 50 см<sup>3</sup> вносят 0,2 см<sup>3</sup> сыворотки крови или взвешивают на аналитических весах 0,15-0,20 г ткани (мышцы, сухожилия, почки, печени и др.). При помощи кусочка стекла навеску опускают на дно колбы. Добавляют 1-2 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты (плотностью 1840 кг/м<sup>3</sup>), 1 г смеси сульфата меди и сульфата калия в качестве катализатора. Содержимое колбы нагревают в вытяжном шкафу. Когда смесь приобретет коричневую окраску, колбу снимают с огня, охлаждают при комнатной температуре, добавляют 2-3 см<sup>3</sup> раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с массовой долей 30 % и продолжают нагревать до получения бесцветного минерализата. Минерализат используют для количественного определения белка.

## 1.3 Ход работы

Минерализат охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup>, объем доводят до метки дистиллированной водой, содержимое перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 5 см<sup>3</sup> полученного раствора минерализата, повторно доводят объем до метки дистиллированной водой. Для проведения цветной реакции 1 см<sup>3</sup> вторично разбавленного минерализата вносят в пробирку, добавляют последовательно 5 см<sup>3</sup> реактива 1 и 5 см<sup>3</sup> реактива 2, содержимое пробирки перемешивают. Одновременно готовят контрольный раствор, используя при этом контрольный минерализат (проба с использованием дистиллированной воды). Через 30 мин определяют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром. Измерение проводят в сравнении с контрольным раствором.

По полученной величине оптической плотности с помощью калибровочного графика определяют концентрацию азота.

Массовую долю белка (X, %) определяют по формуле:

$$X = [C \cdot 250 \cdot 100 / (m_o \cdot 5 \cdot 1 \cdot 10^6)] (100 \cdot 6,25), \quad (1)$$

где C – концентрация азота, найденная по калибровочному графику, мкг/см<sup>3</sup>; 250 – объем минерализата после первого разведения, см<sup>3</sup>; 100 – объем минерализата после вторичного разведения, см<sup>3</sup>; m<sub>o</sub> – масса навески, г; 5 – объем разбавленного минерализата для вторичного разведения, см<sup>3</sup>; 1 – объем раствора, взятые для проведения цветной реакции, см<sup>3</sup>; 10 – множитель для перевода мкг в г; 100 – множитель для перевода в проценты; 6,25 – коэффициент пересчета на белок.

Приготовление реактивов 1 и 2, пример расчета и построение калибровочного графика приведены в приложении к гл. I. лаб. раб. № 1.

## 1.4 Оформление результатов

Полученные экспериментальные и расчетные данные оформляют в виде таблицы, форма которой приведена ниже.

Объект исследования	Оптическая плотность раствора	Концентрация азота по калибровочному графику, мкг/см <sup>3</sup>	Массовая доля в образце, %	
			азота	белка

На основании анализа результатов делают выводы и заключение по работе.

## II ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ БЕЗ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ПРОБ

**Ц е л ь з а д а ч и р а б о т ы :** определить массовую долю суммарных белков в образцах органов и тканей убойных животных ускоренными фотометрическими методами без предварительной минерализации пробы. Задачи выполнения работы связаны с освоением ускоренных фотометрических методов определения общего белка в мясе убойных животных, птицы, мясном фарше, готовых к употреблению мясных продуктах и расчетов массовой доли общего белка в объектах исследования.

### 2.1 Методические указания

Перед выполнением работы следует внимательно ознакомиться с основами фотометрических методов, изложенными в теоретической части настоящей главы. Рекомендуются освоить несколько фотометрических методов без предварительной минерализации проб, основанных на соответствующих цветных реакциях. При фотометрировании в УФ области спектра следует учесть, что при длинах волн 240-300 нм светопоглощение белков почти полностью определяется ароматическими аминокислотами (триптофаном, тирозином и фенилаланином), при 205 нм – пептидными связями. В таблице 1 показана "доля" отдельных хромофоров "среднего" белка в общем спектре поглощения при различных длинах волн.

Для количественного анализа наиболее часто используют поглощение при 280 нм, так как в этом случае белки имеют максимум поглощения, обусловленный содержанием в них ароматических аминокислот – триптофана и тирозина. Для количественного определения белков спектрофотометрическим методом предварительно строят калибровочный график с использованием раствора чистого белка с концентрацией от 0,05 до 2,00 мг/см<sup>3</sup>.

**О б ъ е к т ы и с с л е д о в а н и я :** образцы мышечной ткани разных видов убойных животных и птицы, мясных фаршей, мясных изделий кулинарной готовности (колбаса, окорок, печеночный паштет и т.д.).

**М а т е р и а л ы, р е а к т и в ы, о б о р у д о в а н и е :** мерные колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипетки вместимостью 0,1-5,0 см<sup>3</sup>, мерные цилиндры вместимостью 100-250 см<sup>3</sup>, колбы Эрленмейера вместимостью 100 см<sup>3</sup>, раствор тартрата калия-натрия молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>, раствор гидроксида натрия молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>, биуретовый реактив (0,9 г калия-натрия виннокислого, 3,0 г сульфата меди и 5,0 г йодида калия в 1000 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,2 моль/дм<sup>3</sup>); дистиллированная вода; сывороточный альбумин кристаллический; раствор красителя амидового черного 10В (0,6 г амидового

черного 10В, 21 г лимонной кислоты и  $2,5 \text{ см}^3$  пропионовой кислоты в  $1000 \text{ см}^3$  дистиллированной воды); раствор мочевины молярной концентрацией  $8 \text{ моль/дм}^3$ ; раствор гидроксида натрия молярной концентрацией  $2 \text{ моль/дм}^3$ ; раствор карбамида, содержащий гидроксид натрия (480,48 г мочевины и 80,0 г гидроксида натрия растворяют в  $1000 \text{ см}^3$  дистиллированной воды) центрифуги лабораторные; спектрофотометр; бумажные фильтры, раствор лимонной кислоты молярной концентрацией  $0,1 \text{ моль/дм}^3$ ; раствор красителя оранжевого кислого 12.

Таблица 1 Доля поглощения отдельных хромофоров в общем спектре "среднего" белка

Хромофоры	205 нм	220 нм	250 нм	280 нм
	доля поглощения, %			
Пептидная группа	78,0	32,0	2,9	0,0
Аргинин	2,0	0,0	0,0	0,0
Цистин	0,6	1,0	11,8	2,3
Цистеин	0,1	0,1	0,0	0,0
Метионин	0,6	0,8	0,0	0,0
Гистидин	2,4	7,1	0,0	0,0
Фенилаланин	6,5	3,7	9,4	0,0
Тирозин	4,3	20,0	15,0	31,9
Триптофан	5,5	36,0	61,0	65,7

## 2.2 Подготовка проб

1. При определении массовой доли белка в образцах мышечной ткани, мясных фаршах, мясных изделий 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 гомогенизированного образца взвешивают в колбе Эрленмейера вместимостью  $100 \text{ см}^3$ , прибавляют  $20 \text{ см}^3$  дистиллированной воды и  $10 \text{ см}^3$  раствора гидроксида натрия молярной концентрацией  $1 \text{ моль/дм}^3$ . С помощью воды суспензию переносят в мерную колбу вместимостью  $100 \text{ см}^3$ , доводят до метки дистиллированной водой и хранят 12 ч в холодильнике. После этого  $75 \text{ см}^3$  экстракта (из верхней части колбы) фильтруют через смоченный дистиллированной водой бумажный фильтр диаметром 15 см, удаляя первые  $15 \text{ см}^3$  фильтрата.

2. При определении массовой доли белка в образцах мышечной ткани убойных животных, соленых мясных фаршей методами УФ-спектрофото-метрии образцы предварительно тщательно измельчают сначала ножом на часовом стекле или на мясорубке, а затем на гомогенизаторе.

## 2.3 Ход работы

### 1. Определение массовой доли белка методом Лоури

#### 1.1. Метод Лоури в модификации Дэвени, Гергей (1976)

К 0,2 см<sup>3</sup> исследуемого раствора, содержащего 5-100 мкг белка, прибавляют 1 см<sup>3</sup> реактива С, смешивают и через 10 мин быстро вносят 0,1 см<sup>3</sup> реактива Д, встряхивают и оставляют при температуре (20±5) °С на 30 мин, а затем спектрофотометрируют при  $\lambda = 750$  нм.

Для количественного определения суммарных белков используют соответствующий калибровочный график, построенный для тирозина.

#### 1.2. Метод Лоури в модификации Ластыть (1978)

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 2-5 см<sup>3</sup> щелочного экстракта белков образца, приготовленного в соответствии с прописью подготовки проб, прибавляют 15 см<sup>3</sup> раствора тартрата калия-натрия молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> и доводят объем дистиллированной водой до метки. В зависимости от массового содержания азота для фотометрического определения используют 0,2 см<sup>3</sup> (или более) приготовленного раствора. Объем доводят до 10 см<sup>3</sup> с помощью реактива А. По истечении 30 мин измеряют оптическую плотность раствора при 750 нм на спектрофотометре. Содержание азота определяют на основе калибровочного графика.

### 2. Определение массовой доли белка биуретовым методом

Щелочной экстракт белков объемом 2 см<sup>3</sup> смешивают с 15 см<sup>3</sup> биуретового реактива. После 30 мин инкубирования смеси при 37 °С спектрофотометрически измеряют светопоглощение при  $\lambda = 550$  нм.

Контрольный опыт готовят аналогично, используя вместо образца 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Для построения калибровочного графика применяют кристаллический сывороточный альбумин.

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

#### 3.1. Метод с использованием амидового черного 10 В

Смешивают 2 см<sup>3</sup> щелочного экстракта, содержащего мясные белки, с 25 см<sup>3</sup> раствора красителя амидового черного 10В.

После проведения цветной реакции в течение 1 ч раствор центрифугируют в течение 10 мин при 100 с<sup>-1</sup>. Абсорбцию прозрачного супернатанта определяют спектрофотометрически при  $\lambda = 615$  нм. Массовую долю белка определяют по калибровочному графику.

#### 3.2. Метод с использованием оранжевого кислого 12

К навеске пробы, содержащей около 4 г белка, добавляют из мерной колбы 250 см<sup>3</sup> раствора лимонной кислоты с концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> и гомогенизируют 2-3 мин. Лимонная кислота, употребляемая для эмульгирования белков мяса облегчает связывание кислого красителя белками.



Взвешивают 4 аликвота (в пределах 2-4 г) разбавленного образца с точностью до 0,01 г в 50-миллиметровые поликарбонатные центрифужные пробирки, добавляют воду до 5 г, применяя градуированную пипетку, затем добавляют 25 см<sup>3</sup> раствора красителя, закрывают пробкой и энергично встряхивают. Оставляют на 30 мин или более для взаимодействия красителя с белком и агрегации образовавшихся комплексов. Если смесь будет казаться мутной, то центрифугируют и фильтруют. Определяют концентрацию свободного не связавшегося красителя, измеряя абсорбцию при 475 нм. Удобна специальная проточная кювета с толщиной слоя 0,75 мм. Для расчета пользуются стандартным графиком, который строят на основе анализа мяса методом Кьельдаля того же состава, как анализируемый образец. Это связано с тем, что содержание ионогенных групп аминокислот в разных белках различно.

## 2.4 Оформление результатов

Полученные экспериментальные и расчетные данные рекомендуется оформить в виде таблиц, вид которых приведен ниже.

Результаты определения массовой доли белка в объектах исследования с использованием метода Лоури, биуретового метода и метода связывания красителей белками

Объект исследования	Оптическая плотность раствора	Концентрация азота по калибровочному графику, мкг/см <sup>3</sup>	Массовая доля белка в образце, %

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

**Вопросы для самоконтроля знаний**

1. В чем состоят биологические функции белков?
2. Опишите метод определения белков на основе минерализации проб.
3. Опишите принцип фотометрического определения белков.
4. Опишите принцип определения белков биуретовым методом.
5. Опишите принцип определения белков методом Лоури.
6. Опишите принцип определения белков методами, основанными связывании красителей.

### **Библиографический список**

1. Журавская Н. К. Технохимический контроль производства мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 1999. – 176с.
2. Антипова Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2001. – 2001. – 376 с.

