

МИНИСТЕРСТВО АГРАРНОЙ ПОЛИТИКИ УКРАИНЫ  
ЛУГАНСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

**Кацы Г.Д., Коюда Л.И.,  
Кривич Т.В., Скляревская Е.С.**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ  
ПРОДУКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ**  
(методическое пособие по изучению дисциплины «Биология  
продуктивности»)

Луганск-2008

УДК:591.1:636.03.083(076)

Рецензенты: Г.П.Котенджи доктор сельскохозяйственных наук, профессор;  
Л.В.Полевой доктор сельскохозяйственных наук, профессор;  
Ф.М.Снегур кандидат биологических наук, доцент.

Кацы Г.Д., Коюда Л.И., Кривич Т.В., Скляревская Е.С. Биологические методы оценки продуктивности животных //Методическое пособие по изучению дисциплины «Биология продуктивности»). Луганск:Элтон-2, 2008.- 110 с.

В первом разделе представлены результаты исследований мяса, кожи и систем жизнедеятельности крупного рогатого скота, методы прогнозирования шерстной и молочной продуктивности, а также определение возраста плода крупного рогатого скота. Второй раздел объединяет методы анализа мышечной ткани, молока, яиц, меда, шерсти, гормонов тканей и сыворотки крови, белков растений и ферментных препаратов.

Методическое пособие рекомендуется для студентов по дисциплине «Биология продуктивности сельскохозяйственных животных» является фундаментальной при подготовке специалистов по специальности 7.130201 «Технология производства и переработки продукции животноводства».

Публикуется по решению методической комиссии зообиотехнологического факультета Луганского НАУ, протокол № 4 от 28 февраля 2008 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр
ВВЕДЕНИЕ	
I Биологические методы оценки продуктивности и систем жизнедеятельности сельскохозяйственных животных	5
II Характеристика методов исследований	
1. Биологическая характеристика мышечной ткани	
1.1. Количественное определение суммарных липидов в животных тканях	17
1.2. Количественное определение суммарных белков в животных тканях	19
1.3. Анализ фракционного состава белков мяса на основе их растворимости	23
1.4. Анализ аминокислот в белках мяса на автоматическом аминокислотном анализаторе	24
Определение микроструктурных показателей мяса	29
Определение содержания АТФ в мышечной ткани	34
2. Биологическая характеристика молока	
2.1. Классификация современных методов определения состава молока	36
2.2. Характеристики флуоресцирующих компонентов молока	38
2.3. Выделение и качественный анализ казеина молока	23
2.4. Определение содержания казеиногена в молоке	46
3. Анализ яиц	
3.1. Отбор и составление средней пробы	48
3.2. Определение каротиноидов по цветной шкале	49
3.3. Определение фосфолипидов в желтке	51
3.4. Контроль качества яиц по бактерицидным свойствам белковой оболочки	53
3.5. Метод количественного определения лизоцима	54
4. Анализ меда	55
5. Определение общей серы и серосодержащих аминокислот в шерсти	68
6. Определение гормонов в тканях	
6.1. Методы определения гормонов в тканях	70
6.2. Определение инсулина в поджелудочной железе	71
6.3. Определение гормонов щитовидной железы и надпочечников	74
7. Оценка сыворотки крови	
7.1. Методы иммуноферментного анализа (ИФА)	77
7.2. Определение соматотропного гормона (СТГ) в сыворотке крови крупного рогатого скота методом радиоиммунологического анализа (РИА). Другие гормоны	78
7.3. Количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови, молоке и молозиве методом радиальной иммунодиффузии в геле	85
7.4. Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге	88
7.5. Определение общего белка сыворотки крови	92
7.6. Разделение липидов сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufor	93
8. Классификация белков кормов по принципу их растворимости. Методы определения фракций белков	94
9. Ферментные препараты. Активность ферментов	
9.1. Методы получения ферментных препаратов. Характеристика ферментных препаратов	103
9.2. Определение активности трипсина и амилазы содержимого кишечника	107
9.3. Методы определения активности ферментов	108
Литература	

## **ВВЕДЕНИЕ**

Учебная дисциплина «Биология продуктивности сельскохозяйственных животных» является фундаментальной при подготовке специалистов по специальности 7.130201 «Технология производства и переработки продукции животноводства», а также теоретической основой для глубокого понимания сложных физиолого-биохимических процессов, которые происходят в организме животных.

Предлагаемое методическое пособие составлено на основе материала, собранного из справочников известных авторов и экспериментальных работ, проведенных преподавателями и аспирантами кафедры биологии животных Луганского НАУ за период 1987-2006 гг. Пищевая ценность мяса, оценка качества кожевенного сырья, прогнозирование шерстной продуктивности овец использовались при активном участии ученых Украинского научно-исследовательского института животноводства степных районов им. М.Ф.Иванова «Аскания-Нова». Раннюю оценку потенциала продуктивности животных по составу соматотропного гормона в плазме крови проводили совместно с сотрудниками кафедры медицинской химии Луганского медицинского университета.

В методическом пособии глубоко раскрыты вопросы биологической характеристики мышечной ткани, молока, яиц, меда и шерсти; фракционный состав белков кормов, а также активность и методы получения ферментных препаратов.

## I Биологические методы оценки продуктивности и систем жизнедеятельности сельскохозяйственных животных

Они охватывают различные аспекты жизнедеятельности животного, не ограничиваясь определением количества и качества продукции, но и распространяясь на биологические системы организма, определенным образом реагируя на внешние факторы, - технологию содержания, уровень и полноценность кормления, акклиматизацию и т.д.

**Мясо.** Пищевую ценность мяса определяют по содержанию основных питательных веществ, включая его биологическую и энергетическую ценность, а также по органолептическим показателям [13]. Для этого во время убоя животного отбирают пробу длиннейшей мышцы спины. В образцах определяли: содержание общей влаги, протеина, жира, биологическую ценность мяса (по белково-качественному показателю (БКП), выражающемуся отношением незаменимой аминокислоты (триптофана) к заменимой (оксипролин), а также по сумме незаменимых и заменимых аминокислот и аминокислотному индексу). Нежность (с помощью электроконсистометра Уорнера-Брацлера) и диаметр мышечных волокон (на гистологических срезах), пищевую ценность вареного мяса и бульона (органолептическими методами).

Как видно из приведенных данных (табл. 1, 2), биологическая ценность мышечной ткани у животных специализированных мясных пород выше, чем у молочной. Нежность мяса у помесей шароле  $1/2$  х герефорд  $1/4$  х красная степная  $1/4$  и герефордов значительно выше, чем у красной степной и санта-гертруда. Диаметр мышечных волокон отличается только у санта-гертруда, что связано с более жестким мясом у этого генотипа.

Таблица 1

Биологическая и энергетическая ценность мяса бычков разных пород и помесей

Порода, Помесь	Содержание, %				БКП	Калори йность 1кг мяса, ккал
	белок	жир	трипто фан	осипро лин		
Красная степная	20,47	0,51	0,287	0,046	6,29	1816
Герефордская	21,21	4,21	0,380	0,051	7,41	4016
Санта-гертруда	22,64	2,11	0,387	0,057	6,84	3261
Шароле $1/2$ х герефорд $1/4$ х красная степная $1/4$	19,58	0,58	0,386	0,049	7,86	1857

## Структурно-механические свойства мяса

Порода, помесь	Нежность, кг/см <sup>2</sup> •сек	Диаметр, Мкм
Красная степная	0,713	54,5 ± 1,4
Герефордская	0,629	51,9 ± 1,3
Санта-гертруда	0,751	62,7 ± 1,4
Шароле <sup>1/2</sup> х герефорд <sup>1/4</sup> х красная степная <sup>1/4</sup>	0,513	54,2 ± 1,4

Аминокислотный состав мышечной ткани характеризует биологическую ценность белка. Говядина, в частности, близка по составу с женским молоком [25]. Аминокислоты определяют методом хроматографии на ионообменных смолах на автоматическом аминокислотном анализаторе На - 1200 Е.

Как видно из данных таблицы 3, в белках длиннейшей мышцы спины бычков породы санта-гертруда и их помесей с красной степной породой по сравнению с аналогами материнской (красной степной) породы содержалось больше таких аминокислот, как лизин, аргинин, глицин, лейцин, фенилаланин и глутаминовая кислота [27].

Лизин - наиболее важная незаменимая аминокислота, тесно связанная с процессом кроветворения, она играет большую роль в образовании гемоглобина и проницаемости капилляров. Лизина больше содержится в белках мышечной ткани гибридных бычков - 16,35-19,98 мг/г. Биохимический состав крови подтверждает данные, полученные при определении лизина. В крови гибридных бычков содержалось больше гемоглобина - 14,26 г %, общего белка - 6,67,  $\gamma$ -глобулинов - 3,06 г %, в то время как у аналогов красной степной породы соответственно 12,8; 6,37 и 2,2. По сумме всех аминокислот белков мышечной ткани гибридные животные превосходили красных степных на 11,8-14,4 %. Преимущество сохранилось за гибридными животными по заменимым и незаменимым аминокислотам.

Таблица 3

Содержание аминокислот белка длиннейшей мышцы спины бычков,  
МГ В Г

Аминокислоты	Красная степная порода	Санта-гертруда х красная степная	Укрупненный тип санта-гертруда
Лизин	15,57	16,35	19,98
Гистидин	8,46	7,88	10,76
Аргинин	10,48	13,91	13,67
Аспарагиновая кислота	16,11	15,84	15,34
Треонин	8,52	7,88	10,26
Серин	8,26	7,13	8,33
Глутаминовая кислота	26,39	30,59	26,84
Пролин	8,77	10,29	8,63
Глицин	9,10	13,30	11,50
Аланин	9,22	12,06	8,34
Валин	8,81	8,07	10,69
Изолейцин	8,32	7,46	8,34
Лейцин	14,08	14,33	15,82
Тирозин	7,13	6,53	8,15
Фенилаланин	8,85	7,95	10,69
Сумма всех аминокислот	168,07	179,57	187,34
Сумма незаменимых аминокислот	83,09	83,83	100,21
Сумма заменимых аминокислот	84,98	95,74	87,13
Аминокислотный индекс	0,98	0,88	1,15
По отношению к красной степной породе: все аминокислоты	100	100,6	111,4
Незаменимые	100	100,9	120,6
Заменимые	100	112,7	102,5

**Кожа.** Качество кожи определяют по массе парной шкуры, ее площади, гистологической структуре, результатам физико-механических испытаний готовых кож (таблица 4), химическому составу, а также органолептической оценке [14].

Таблица 4

Показатели качества шкур и готовых хромовых кож

Помеси	Убойная масса животного, кг	Масса парной шкуры, кг	Площадь шкуры, дм <sup>2</sup>	Готовые кожи			
				толщина, мм	напряжение при появлении трещин лицевого слоя, 9,8 МПа	предел прочности, 9,8 МПа	удлинение при разрыве, %
Геррефорд <sup>1</sup> / <sub>2</sub> х красная степная <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	404±12	38,2±1,9	354±3	1,29	1,31	1,43	36,4
Киан <sup>1</sup> / <sub>2</sub> х геррефорд <sup>1</sup> / <sub>4</sub> х красная степная <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	413±7	41,3±1,6	366±9	1,30	1,59	1,80	32,4
Шароле <sup>1</sup> / <sub>2</sub> х геррефорд <sup>1</sup> / <sub>4</sub> х красная степная <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	452±5	42,4±2,1	400±2	1,30	1,59	1,80	32,6

При гистологической оценке на препаратах измеряют толщину кожи в т.ч. слои дермы, а также площади потовых и сальных желез и соотношение длины к ширине потовой железы. Указанные показатели кожи коррелируют с физико-механическими свойствами готовой кожи. Так, нагрузка при разрыве на полоску шириной 10 мм *отрицательно* коррелирует с площадью потовых желез ( $r = - 0,58$ ), площадью сальных желез ( $r = - 0,40 - 0,45$ ), толщиной сосочкового слоя ( $r = - 0,58 - 0,67$ ); *положительно* - с формой (Д:Ш) потовых желез ( $r = 0,53 - 0,62$ ). Показатель удлинения *положительно* коррелирует с толщиной сосочкового слоя ( $r = 0,31$ ) и *отрицательно* с формой потовых желез ( $r = 0,45$ ), т.е. чем уже железы, тем выше показатель удлинения и лучше качество готовой кожи.

Установленные взаимосвязи подтверждены в последующих опытах на животных других пород [19].

Породные, видовые и возрастные изменения структуры кожи приведены в книге Кацы Г. «Кожа млекопитающих: теория и практика» [20].

**Системы жизнедеятельности.** Оценка адаптационных особенностей разных видов сельскохозяйственных животных - задача актуальная, особенно в связи с интенсивной миграцией пород и межпородным скрещиванием местных пород с импортными. Целесообразность таких акций часто научно не обоснована, что внезапно или через некоторое время вызывает разочарование.

Для оценки адаптационных особенностей животных используют разные методы. Ученые справедливо показывают, что естественная резистентность животных характеризуется многими гематологическими и физиологическими показателями и имеет полигенный характер, поэтому следует оценивать ее не по одному показателю, а по их совокупности [21].

В своих работах мы определяем иммунологические, физиологические и продуктивные показатели животных, которые позволяют комплексно судить о состоянии терморегуляторной, репродуктивной и лактационной систем организма животных в конкретных хозяйственно-климатических условиях. На основе анализа перечисленных показателей можно сделать заключение о жизнеспособности телят и взрослых животных определенного генотипа. Например, тестирование животных черно-пестрой породы, разводимых в нетрадиционных условиях Луганской области, по защитным системам организма и анализу продуктивности показало, что четвертое экологическое поколение акклиматизантов по всем показателям приближается к местной популяции коров этой породы. На данном этапе, акклиматизацию животных черно-пестрой породы можно считать законченной.

Биопробы сельскохозяйственных животных с успехом можно использовать для экологического мониторинга. Для этого наиболее доступным и подходящим объектом являются волосы [16]. Проведено 2 опыта на коровах красной степной породы в промышленных районах Луганской области. Химический анализ волос осуществляли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра С-115. Исследовали содержание Cu, Zn, Fe и Mn. Установлено, что уровень металла в волосах исследуемых коров почти в три раза превышает норму.

Показана также возможность использования гистологического метода с целью контроля за состоянием животных и оценки технологии их содержания [15]. На дойных коровах черно-пестрой и красной степной породы и откармливаемых бычках красной степной породы установлено, что в условиях гиподинамии крупного рогатого скота на комплексах у них отмечается утолщение кожи на 14,3 - 30,8 %, а на фоне высокой относительной влажности воздуха и повышенной загазованности это приводит к функциональным перегрузкам систем терморегуляции: площадь потовых желез при этом увеличивается на 27,8 - 49,4 %. Следствием указанных изменений является снижение продуктивности скота.

## Методы прогнозирования продуктивности

**Шерстная продуктивность.** Между характером шерстного покрова ягнят при рождении с последующей продуктивностью и выживаемостью (сохранностью) молодняка существует определенная взаимосвязь, на что указывают многие авторы. Предложена классификация типов шерстного покрова мериносовых ягнят: I - шерстный покров типичный для мериносовых ягнят, «песига» (собачий волос) не заметна или просматривается только на ляжке; II - шерстный покров типичный для мериносовых ягнят, «песига» прорастает через основную тонкую извитую шерсть по всему туловищу; III - шерстный покров не типичный для мериносовых ягнят, длинные и прямые волокна густо прорастают по всему туловищу [12].

Наиболее желательными для производства высококачественной шерсти являются ягнята II типа. Ягнята с I типом покрова в последующем менее продуктивны, хотя и характеризуются высоким качеством шерсти; они отличаются также пониженной жизнеспособностью. Ягнята с III типом покрова по настригу шерсти не отличаются от II типа, но шерсть у них качеством ниже; таких ягнят не рекомендуем оставлять на племя, они подлежат выбраковке с последующим откормом на мясо.

Разработанную и испытанную шкалу апробировали на овцах различных пород и типов: асканийская тонкорунная, цигайская, асканийский кроссбредный тип, асканийский тип черно-головых овец, помеси линкольн х цигайские - всего 800 новорожденных ягнят [33].

Установлено, что наиболее высокий уровень шерстной продуктивности у асканийской тонкорунной и цигайской пород, характерный для ягнят II типа шерстного покрова при рождении, т.е. среднеспесижные. Так, превосходство сравнительно с ягнятами I типа составило в асканийской породе 0,82 кг в мытом волокне (или на 23 %), в цигайской - 0,47 кг (24 %).

Среди кроссбредных, черноголовых и линкольн х цигайских ягнят наиболее продуктивными в 15-месячном возрасте были ягнята III типа, как по настригу шерсти, так и по живой массе.

Особенно значительными были преимущества по настригам шерсти в чистом волокне у ягнят III типа сравнительно с I типом среди линкольн х цигайских баранчиков - на 1,6 кг или на 75 %. У ягнят III типа настриг шерсти был выше на 0,38 кг в мытом волокне или на 39,6 %. Для ягнят с шерстным покровом I типа был характерным самый низкий настриг шерсти в 15-месячном возрасте.

Таким образом, отбор ягнят по типу шерстного покрова при рождении дает возможность без дополнительных затрат труда и средств на содержание овец значительно повысить собственную продуктивность овец (живую массу, настриг шерсти) и как результат повысить экономическую эффективность и конкурентоспособность овцеводства в стране.

## *Молочная продуктивность.*

### **Методы оценки функциональных резервов эндокринной системы у крупного рогатого скота (Еременко В.И., 2001)**

Основным методом оценки функционального состояния желез внутренней секреции является определение базального уровня гормонов в крови. Однако такой метод не всегда объективно отражает метаболическое состояние организма. Прежде всего, это связано с тем, что уровень гормонов в крови подвержен влиянию паратипических факторов. Поэтому классическим методом оценки эндокринных желез считается метод функциональных нагрузок, позволяющий выявить генетически детерминированные потенциальные резервы индивидуально у каждого животного. Это позволяет проводить индивидуальную оценку животного и целенаправленную селекционную работу по одинаковым признакам животных, а показатели потенциальных резервов использовать как тесты раннего прогнозирования продуктивности животных. Предложенные методы разрабатывались в лаборатории нейроэндокринной регуляции ВНИИФБиГ.

#### *Определение функциональных резервов щитовидной железы*

Для определения функциональных резервов щитовидной железы используют тиреотропный гормон (ТТГ). Перед введением ТТГ берут кровь из яремной вены и сразу внутримышечно вводят ТТГ на физрастворе в дозе 0,5 ед/кг живой массы тела. После введения кровь отбирают через 0,5; 1 и 2 часа. В крови определяют тироксин и трийодтиронин. Расчет функциональной активности проводят по формуле:

$$Kатг = (T_1 - T_0) / T_0;$$

где  $Kатг$  - коэффициент активности тиреоидных гормонов;  $T_0$  - уровень гормона до нагрузки;  $T_1$  - уровень гормона через 2 часа после нагрузки ТТГ.

Для раннего прогнозирования молочной продуктивности тестирование телочек этим методом рекомендуется проводить в 2-месячном возрасте или старше. Телочки, у которых коэффициент  $Kатг > 0$  относят к высокому уровню функциональных резервов, а если  $Kатг < 0$ , то к низкому. Чем ниже  $Kатг$ , тем выше прогнозируемый надой за лактацию ( $r = -0,48$ ).

#### *Определение функциональных резервов инсулярного аппарата*

Для определения функциональных резервов инсулярного аппарата используется инсулиноген - глюкоза. С целью прогнозирования в раннем возрасте молочной продуктивности тестирование телочек по этому показателю рекомендуется проводить с 2-месячного возраста и старше.

В 2-месячном возрасте эту нагрузку рекомендуется проводить путем выпаивания 10% раствора глюкозы в дозе 1 г/кг живой массы. В старшем

возрасте с 6 месяцев использовать 40% раствор глюкозы путем его введения внутривенно. Кровь из яремной вены отбирали перед нагрузкой и после нее через 0,5; 1; 2 и 4 часа. Коэффициент активности инсулярного аппарата ( $K_{aia}$ ) рассчитывают по формуле:

$$K_{aia} = (I_1 - I_0) / (G_1 - G_0),$$

где  $I_1 - I_0$  - уровень инсулина до и после нагрузки;  $G_1 - G_0$  - уровень глюкозы до и после нагрузки.

$K_{aia}$  находят по величине прироста инсулина на единицу прироста глюкозы после проведения нагрузки. Животных с  $K_{aia} < 2$  относят к группе с высоким, а  $K_{aia} > 2$  - с низким потенциалом молочной продуктивности.

Чем ниже  $K_{aia}$ , тем больше прогнозируемая молочная продуктивность ( $r = -0,61$ ).

#### *Метод оценки функциональных резервов коры надпочечников*

С целью выявления функциональных резервов коры надпочечников используют адренокортикотропный гормон (АКТГ). Этот гормон вводится внутримышечно в дозе 0,5 ед/кг живой массы. Для определения уровня кортизола кровь отбирают из яремной вены до введения гормона, через 1 час после первой инъекции и сразу вводят вторую инъекцию в такой же дозе с последующим взятием крови через 1, 2 и 3 часа. Индекс функциональной активности коры надпочечников ( $I_{акн}$ ) рассчитывают по формуле:

$$I_{акн} = K_2 / K_1,$$

где  $K_1$  - уровень кортизола через 1 час после первой нагрузки;  $K_2$  - уровень кортизола через 1 час после второй нагрузки.

По величине соответствующей реакции коры надпочечников после проведения нагрузки рекомендуется разделить животных на стрессчувствительных и стрессрезистентных с 6-месячного возраста. К стрессрезистентным относят телочек, у которых  $I_{акн} > 1$ , а если  $I_{акн} < 1$  - это стрессчувствительные телочки. Чем выше  $I_{акн}$  (стрессоустойчивые животные), тем выше прогнозируемая продуктивность ( $r = 0,55$ ).

#### *Оценка функционального состояния резервов тестостеронсинтезирующей системы*

Оценку функциональных резервов тестостеронсинтезирующей системы у телочек рекомендуется проводить с помощью хориогонического гонадотропина (ХГ).

Гонадотропин в дозе 3000-6000 МЕ (в зависимости от возраста животных) рекомендуется вводить внутривенно 3 раза с интервалом 24 часа. Кровь отбирают перед введением гормона и определяют концентрацию тестостерона. Индекс активности тестостеронсинтезирующей системы ( $I_{атс}$ ) рассчитывают по формуле:

$$I_{atc} = K_2 / K_1,$$

где  $K_1$  - концентрация тестостерона через 48 часов после первой нагрузки;  $K_2$  - концентрация тестостерона через 48 часов после второй нагрузки.

Поскольку в 2-месячном возрасте тестостеронсинтезирующая система телочек не «зрелая», то тестирование животных по этому показателю рекомендуется проводить с 6-месячного возраста. Телочки, у которых  $I_{atc} < 1$ , относят к группе с низкими резервами тестостеронсинтезирующей системы, а телочек с  $I_{atc} > 1$  - с высоким резервом тестостеронсинтезирующей системы. Чем ниже  $I_{atc}$ , тем выше молочная продуктивность ( $r = -0,57$ ).

### ***Ранняя оценка потенциала продуктивности животных по составу соматотропного гормона в плазме крови***

Возможность оценки потенциала молочной продуктивности крупного рогатого скота позволяет еще в первые дни жизни животных выделить наиболее продуктивных и отобрать их для дальнейшей работы.

Исследовали особенности обменных процессов у помесных телочек голштин х черно-пестрая и голштин х красная степная порода I и II поколений ( $F_1$  и  $F_2$ ). Для этой цели определяли концентрацию соматотропного гормона (СТГ), т.к. он многопланово влияет на белковый, углеводный и жировой обмен.

Возраст животных - новорожденные и 12-месячные. Кровь отбирали общепринятым методом. Плазму готовили центрифугированием. Показатели содержания СТГ в плазме крови определяли методом радиоиммунного анализа. Радиоактивность образцов плазмы подсчитывали на сцинтилляционном счетчике «Гамма-12» с использованием коммерческого набора определения СТГ «JB - YH» I (Франция). Исследовано плазму на содержание в ней ионов  $Na^+$  и  $K^+$ . Концентрацию этих ионов измеряли на биологическом алкале-анализаторе.

Установлено, что максимальный показатель содержания СТГ в плазме крови в период новорожденности наблюдается у помесей голштин х черно-пестрая  $F_1$  ( $24,6 \pm 1,7$  нг/мл). Среди помесей второго поколения более высокий показатель принадлежит телочкам голштин х красная степная ( $13,1 \pm 0,7$  нг/мл), у помесей же голштин х черно-пестрая значительно меньше -  $7,4 \pm 0,5$  нг/мл.

В возрасте 12 месяцев все опытные группы имели пониженный показатель содержания СТГ по сравнению с новорожденными телочками, что связано со снижением интенсивности обменных и ростовых процессов в организме более старших животных.

За 6 месяцев выращивания максимальные среднесуточные приросты живой массы были получены в группах голштин х черно-пестрая  $F_1$  и голштин х красная степная  $F_1$ . Коэффициенты корреляции живой массы в 6

месяцев и показателя содержания СТГ в плазме крови (в период новорожденности) составили соответственно  $r = +0,86$  и  $r = + 0,54$ . В возрасте 12 месяцев живая масса телок этих групп была наибольшей  $232,7 \pm 10$  и  $215,5 \pm 12$  кг соответственно.

Подробно о влиянии СТГ на белковый, углеводный, жировой и минеральный обмены смотрите работу Кацы Г.Д., Вишницкая И.А., Семенов А.В. «Ранняя оцінка потенціалу продуктивності за складом соматотропного гормону в плазме крові» (2001).

Таким образом, установлено, что прогнозирование уровня молочной продуктивности и интенсивности роста по содержанию СТГ в плазме крови новорожденных телочек теоретически обосновано и подтверждено в эксперименте.

Ранняя оценка продуктивности животного - вечная мечта и желание животновода. Существует много методов прогнозирования и простых и сложных. Желательными являются доступные и надежные. Но, к сожалению, последнего качества у этих методов не хватает. Поэтому поиски продолжаются.

На кафедре биологии животных Луганского НАУ разработан способ раннего прогнозирования уровня молочной продуктивности крупного рогатого скота, основанный на измерении биофизического показателя крови - времени спин-решеточной релаксации протонов [17, 18]. Метод позволяет вести прогнозирование на стадии новорожденных телочек (табл. 5). Время релаксации образцов крови определяется одним из современных методов диагностики - методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР).

Измеряемый параметр - время спин-решеточной релаксации протонов воды отображает динамические изменения воды в клеточных мембранах, количество связанной и свободной воды в клетках, передвижение молекул во внеклеточном и внутриклеточном пространстве, проницаемость клеточных мембран, т.е. позволяет судить об уровне обмена веществ в организме животного.

Таблица 5

Результаты диагностики уровня молочной продуктивности  
ЯМР-методом

Количество телочек, голов	Измеряемый параметр	Среднее значение по группе		Среднее значение по высокопродуктивной группе		Среднее значение по низкопродуктивной группе	
		X	Lim	x	lim	X	Lim
50	T <sub>1</sub> мсек	1077,3	862-1388	1151,1	1098-1388	951,7	862-1000

Удой молока по группе высокопродуктивных коров (n = 31) составил по I лактации  $4513 \pm 233$  кг, по III лактации -  $4948 \pm 155$  кг, по группе низкопродуктивных коров -  $3037 \pm 180$  кг и  $3344 \pm 109$  кг соответственно.

**Кожсырье.** Простой и доступный способ отбора образцов кожи при жизни животного (биопсия), разработанный на кафедре биологии животных Луганского НАУ, позволил предложить метод прижизненной оценки качества кожевенного сырья [19]. Качество его у крупного рогатого скота будет выше при плотной укладке пучков коллагеновых волокон (без жировых прослоек между ними), средней толщине кожи (4,5 - 5,5 мм), неглубоком залегании волосяных фолликулов (1 - 1,2 мм), средней густоте (10 - 12 шт/мм<sup>2</sup>) и площади потовых желез (0,20 - 0,25 мм<sup>2</sup>).

### ***Определение возраста плода крупного рогатого скота***

Опытный специалист-животновод и практик без особого труда смогут определить возраст плода. Однако при недостаточном опыте, в спорных случаях, а также при ветеринарной экспертизе более надежным методом будет гистологический. Особенно это относится к плодам еще не обволосненным.

Метод несложный. Для приготовления гистопрепарата используется кусочек кожи с середины бока груди. Участок взятия образца важен, так как интенсивность развития структур кожи у плода очень отличается на различных топографических участках.

Фиксацию проводят в 10% растворе формалина. Уплотняющая среда (пищевой желатин) и красители (гематоксилин и судан-3) доступные, срезы готовятся на замораживающем микротоме [23].

***Микроскопический анализ*** проводится с помощью микроскопа при разных увеличениях: от 25 до 200 х. На срезах вертикальной ориентации учитывают глубину залегания волосяных фолликулов, наличие рядом с фолликулами протоков потовых желез, клеток будущей сальной железы (или самой сальной железы), наличие секреторных отделов потовых желез и степень их развития, а также окраску суданом-3 наружной поверхности эпидермиса.

Все это записывается в журнал. Полученные данные сравнивают с морфологической картиной, приведенной в таблице 6. Какому возрасту соответствуют совпадающие картины, тот и является искомым.

Таблица 6

Стадии развития волосяных фолликулов и кожных желез у плодов крупного рогатого скота

Длина Плода См	Морфологическая картина	Стадия	Возраст плода, месяцы
3,2	Видны копытца, глазные ямки, наружные половые органы, хвост. Под микроскопом виден пласт эпидермальных клеток и коллагеновые волокна дермы параллельной слегка волнистой ориентации	1.Предфолликулярная	1,3
19	Туловище безволосое. От эпидермиса в подлежащую дерму, начинают вращать тяжки клеток будущих волосяных фолликулов, глубина их залегания от 22 до 263 мкм, потовых и сальных желез нет.	2. Закладки волосяных Фолликулов	2,5
29	Туловище безволосое. Из эпидермиса рядом с фолликулом начинают вращать вглубь дермы протоки потовых желез, сальных желез нет.	3.Образования протоков потовых желез	3 - 3,5
32	Туловище безволосое. Начинают развиваться секреторные отделы потовых и сальных желез, фолликулярные каналы суданофильны, формируются волосяные луковицы.	4.Развития секреторных отделов потовых и сальных желез	4
36	Единичные волоски пробиваются наружу вокруг зачатков роговых отростков, глаз, рта, в ушах, а также вокруг копытца. В волосяных луковицах начинают формироваться волосяные волокна.	5.Кератинизации волос внутри фолликула и роста кожных желез: а)начало кератинизации появление единичных волос на поверхности головы;	4,5 - 5,0
40	На поверхности кожи туловища появляются редкие волосы.	б) массовый выход волос на поверхность кожи;	5 - 5,5
46	Густота волос на поверхности кожи увеличивается, количество секреторных отделов потовых и сальных желез возрастает.	в) интенсивный рост секреторных отделов потовых и сальных желез;	6
55	Углубление волосяных фолликулов в дерму, в основном, завершается; структура кожи сходна с таковой новорожденного теленка.	г) завершение углубления волосяных фолликулов;	7
80	Структура кожи не отличается от новорожденного, эпидермис покрыт жировой смазкой.	д) интенсивный рост волос и сальных желез.	8 - 8,5

## II Характеристика методов исследований

### 1. Биологическая характеристика мышечной ткани

#### *Состав мышечной ткани*

(Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А., 2001.)

#### **1.1. Количественное определение суммарных липидов в животных тканях.**

Для количественного определения суммарных липидов в животных тканях (разные отрубы мясной туши, субпродукты, яичный желток, жировые ткани) необходимо провести *экстракцию* липидной фракции в аппарате Сокслета и определить *массовую долю* суммарных липидов *гравиметрически* и (или) колориметрически.

Для экстракции и хранения растворов липидов используют посуду из темного стекла и применяют смесь хлороформа и метанола в соотношении 2:1- это метод Фолча, позволяющий извлекать 90-95% всех клеточных липидов. Преимуществом метода Фолча является то, что используемая смесь растворителей не проявляет селективности по отношению к тем или иным группам липидов.

Предварительно обезвоженный образец ткани экстрагируют петролейным эфиром, диэтиловым эфиром или смесью эфира и этанола. Полное извлечение липидов из тканей достигается путем многократной экстракции летучим растворителем в аппарате Сокслета (рис 1.).

Все части аппарата плотно соединяются между собой при помощи шлифов. Пары эфира из экстракционной колбы при нагревании поднимаются по трубке экстрактора и попадают в холодильник. Здесь они охлаждаются, сгущаются и каплями стекают в экстрактор, где в бумажной гильзе находится исследуемый материал. Гильза постепенно наполняется эфиром, который экстрагирует жир из ткани. Когда уровень эфира поднимется выше верхнего колена сифонной трубки, эфир вместе с растворенным в нем жиром стечет в нижнюю часть аппарата – экстракционную колбочку. Жир остается в колбочке, а пары эфира вновь поднимаются и экстрагируют новую порцию жира. Исследуемое вещество, подвергаясь многократной повторной экстракции, полностью обезжиривается. Жир перемещается в колбочку.

*а) Гравиметрический метод определения массовой доли экстрагированных липидов в аппарате Сокслета.*

Образец мяса тщательно измельчают ножом на часовом стекле, взвешивают навеску массой  $3,0 \pm 0,0002$  г и помещают в тарированный бюкс с прокаленным до постоянной массы песком. Стеклопалочкой перетирают мясо с песком и высушивают в сушильном шкафу при  $100-105^{\circ}\text{C}$  до постоянной массы. Вычисляют массовую долю влаги в исследуемом образце. Сухой остаток используют для определения суммарных липидов.

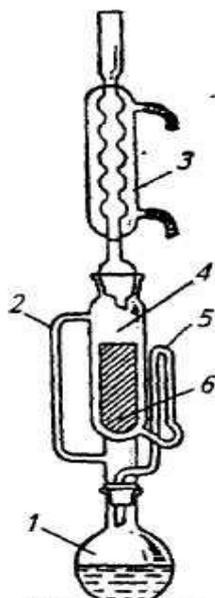


Рис. 1. Аппарат Сокслета:

1 - приемная колба, 2 - трубка для поступления паров растворителя из колбы в экстрактор; 3 - холодильник; 4 - экстрактор; 5 - сифонная трубка; 6 - бумажная гильза с навеской исследуемого материала

Сухую пробу переносят в предварительно взвешенную гильзу из фильтровальной бумаги, гильзу повторно взвешивают и помещают в экстрактор аппарата Сокслета. В экстракционную колбу аппарата наливают эфир и соединяют все части прибора. Прибор помещают на водяную баню. Холодильник соединяют с водопроводным краном, включают воду и нагревают баню до 45-50°C. Ориентировочная продолжительность экстрагирования 4-6 часов. Конец экстрагирования определяют, поднося к экстрактору часовое стекло, куда стекает немного эфира. Экстрагирование считается законченным, если после испарения эфира на стекле не остается налета жира.

По окончании экстрагирования гильзу вынимают из экстрактора, высушивают до постоянной массы и вычисляют массовую долю липидов в исходной навеске по формуле:

$$X_1 = 100(m_3 - m_4) / (m_1 - m_0),$$

где  $m_3$  - масса гильзы с навеской до обезжиривания, г,  $m_4$  - масса гильзы с навеской после обезжиривания, г;  $m_1$  - масса бюкса с песком и навеской до высушивания, г;  $m_0$  - масса бюкса с песком, г.

Массовую долю липидов (% к массе абсолютного сухого вещества) определяют по формуле:

$$X_2 = 100(m_3 - m_4) / (m_3 - m_5),$$

где  $m_5$  - масса гильзы, г.

*б) Гравиметрический метод определения массовой доли экстрагированных липидов в пленочном испарителе.*

Навеску массой 100 г очищенного от жира и пленок сердечной мышцы или печени измельчают при температуре 2-4°C и гомогенизируют в органическом растворителе с частотой вращения 116,6-133,3 с<sup>-1</sup> при комнатной температуре 1-2 мин. Гомогенат переносят в колбу с притертой пробкой и заливают тремя объемами смеси хлороформ-метанол в соотношении 2:1. Экстракцию липидов проводят при комнатной температуре при постоянном помешивании с помощью механической или магнитной мешалки в течение 30 мин.

Суспензию центрифугируют с частотой вращения 33,3 м<sup>-1</sup> в течение 15-20 мин, органическую фазу отделяют, а остаток переносят в прежнюю колбу и повторяют экстракцию еще 2 раза в тех же условиях. Объединенные экстракты упаривают в вакууме, остаток липидов растворяют в 5-10 см<sup>3</sup> смеси хлороформ-метанол-вода (6:3:0,45).

Для удаления нелипидных примесей используют сефадекс G-25, который предварительно освобождают от мелких частиц и высушивают, суспендируют в трех объемах смеси хлороформ-метанол-вода (6:3:0,45) и оставляют набухать в течение 10-14 ч. Набухшим сефадексом заполняют колонку размером 2x15 см, на дно которой предварительно помещают промытую стекловату. После заполнения на поверхность сефадекса также кладут стекловату и готовую колонку промывают одним объемом смеси. Для очистки на колонку наносят экстракт липидов (20-30%) и элюируют их 1,5-2 объемами той же смеси. В элюате содержатся практически все липиды, нелипидные примеси остаются на колонке и могут быть смыты с нее смесью хлороформ-метанол (1:1).

Очищенный от нелипидных примесей экстракт переносят в колбу пленочного испарителя, растворитель отгоняют, к остатку добавляют 10 см<sup>3</sup> безводного бензола, тщательно перемешивают и отгоняют бензол. Липиды, освобожденные от следов воды, растворяют в небольшом объеме свежеперегнанного бензола, переносят в пробирку с притертой пробкой и хранят в темноте на холоде.

Круглодонную колбу для пленочного испарителя доводят до постоянной массы, помещают в нее отмеренный объем липидного экстракта, содержащий 10-20 мг липидов, и растворитель упаривают в токе азота или в пленочном испарителе. Колбу с осадком липидов доводят до постоянной массы в вакуум-эксикаторе нпд КОН. Сухую массу липидов рассчитывают по разности постоянной массы колбы с осадком и пустой колбы. Взвешивание проводят на аналитических весах.

### **Количественное определение суммарных белков в животных тканях.**

Классическим методом определения массовой доли белков в мясе и мясопродуктах является метод Кьельдаля, предложенный для определения общего азота в различных материалах в 1883 г. За столетие сохранились все основные стадии оригинального метода Кьельдаля – минерализация, отделение аммиака дистилляцией и титрование.

*а) Определение массовой доли белков в мясе методом Кьельдаля с минерализацией проб.*

*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 (мышц, сухожилий, почек, печени). При помощи кусочка стекла навеску опускают на дно колбы. Добавляют 1,2 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты, 1 г смеси сульфата меди и сульфата калия в качестве катализатора. Содержимое колбы нагревают в вытяжном шкафу (процесс минерализации). Когда смесь приобретает коричневую окраску, колбу снимают с огня, охлаждают при комнатной температуре, добавляют 2-3 см<sup>3</sup> раствора пероксида водорода с массовой долей 30% и продолжают нагревать до получения бесцветного минерализата. Последний используют для количественного определения белка.

*Порядок проведения анализа.* 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.

*Реактив 1.* 10 г фенола и 0,05 г нитропрусида натрия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup> и объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

*Реактив 2.* 5 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. После охлаждения добавляют исходный раствор гипохлорида натрия из расчета достижения его массовой концентрации 0,42 г/дм<sup>3</sup> или 0,2 г дихлоризоцианурата натрия. Объем раствора доводят дистиллированной водой до метки.

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.

*Построение калибровочного графика.* Для построения графика используют стандартный раствор сульфата аммония, для приготовления которого берут 0,236 г сульфата аммония, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 60°C, вносят в мерную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup>, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до метки. Этот раствор является стандартным и содержит 0,1 мг азота в 1 см<sup>3</sup>.

В мерные колбы вместимостью по 100 см<sup>3</sup> вносят следующие объемы стандартного раствора (см<sup>3</sup>): 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0. После доведения объемов растворов в колбах дистиллированной водой до

метки получают серию рабочих растворов концентрацией 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мкг азота в 1 см<sup>3</sup>.

Для проведения цветной реакции в пробирки помещают по 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора, добавляют 5 см<sup>3</sup> реактива 1 и 5 см<sup>3</sup> реактива 2, перемешивают и через 30 мин измеряют величину оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 625 нм или на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром с толщиной поглощающего свет слоя 1 см по отношению к контрольному опыту. Опыт повторяют три раза. Для каждого определения готовят новый стандартный раствор.

По полученным средним данным из трех стандартных растворов строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию азота ( $c$ , мкг/см<sup>3</sup>), а на оси ординат – соответствующую ей оптическую плотность ( $D$ ) при длине волны 750 нм. Калибровочный график должен проходить через начало координат. По полученной величине оптической плотности с помощью калибровочного графика определяют концентрацию азота.

Массовая доля белка (%)

$$X = [c \times 250 \times 100 / (m \times 5 \times 1 \times 10^6)] (100 \times 6.25),$$

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>;  $m$  – масса навески, г; 5 – объем разбавленного минерализата для вторичного разведения, см<sup>3</sup>; 1 – объем раствора, взятый для проведения цветной реакции, см<sup>3</sup>; 10<sup>6</sup> – множитель для перевода микрограммов в граммы; 100 – коэффициент для перевода в проценты; 6,25 – коэффициент для пересчета на белок.

Полученные экспериментальные и расчетные данные оформляют в виде таблицы.

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

*б) Определение белков в тканях животных фотометрическим методом без минерализации проб.*

Это ускоренный метод анализа. 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. 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.

*Подготовка проб к анализу.* При определении массовой доли белка биуретовым методом образец мяса 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 см<sup>3</sup>, прибавляют 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 10 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>. С помощью воды суспензию переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят до метки дистиллированной водой и хранят 12 ч в холодильнике. После этого 75 см<sup>3</sup> экстракта (из верхней части колбы) фильтруют через смоченный дистиллированной водой бумажный фильтр диаметром 15 см, удаляя первые 15 см<sup>3</sup> фильтрата.

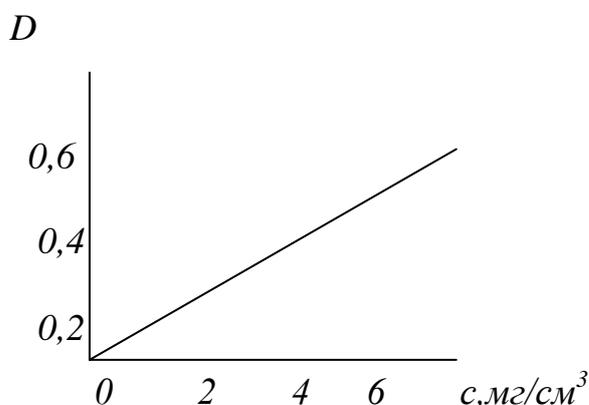
*Биуретовый реактив.* 0,9 г тартрата калия-натрия, 3,0 г сульфата меди и 5,0 г иодида калия растворяют в 1000 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,2 моль/дм<sup>3</sup>.

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°C светопоглощение измеряют на спектрофотометре при длине волны 550 нм.

Контрольный опыт готовят аналогично, используя вместо образца 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

*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 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, отбирают 1 см<sup>3</sup> и доводят объем до 10 см<sup>3</sup> и т.д.

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.



Калибровочный график определения белка биуретовым методом.

### 1.3. Анализ фракционного состава белков мяса на основе их растворимости.

Белки мяса и мясопродуктов можно разделить на растворимые в воде (белки саркоплазмы), в солевых растворах (белки миофибрилл) и нерастворимые в водно-солевых растворах, условно называемые белками стромы.

*Водорастворимые* белки саркоплазмы включают миоген, миоглобин (природный пигмент), миоальбумин, глобулин X.

К *солерастворимым* (миофибриллярным) белкам относятся миозин, актин, тропомиозин, тропониновый комплекс.

Фракция стромы включает белки, входящие в состав сарколеммы и внутримышечной соединительной ткани, которая связывает мышечные волокна в пучки, а также белки ядер. Фракция стромы объединяет белки: коллаген, эластин, ретикулин, а также гликопротеиды – муцины и мукоиды. Последние представляют собой слизистые белки, выполняющие защитные функции и облегчающие скольжение мышечных пучков. Все эти белки можно извлечь щелочными растворами. На практике их часто называют щелочерастворимой белковой фракцией мышечной ткани.

Количественное соотношение различных фракций, их состояние определяют не только технологические свойства сырья и продуктов, но и их биологическую ценность.

Среди ускоренных фотометрических методов большое признание получила *биуретовая реакция*.

*Подготовка проб к анализу.* Мышцы различных животных (говядина, свинина, баранина) аналогичных анатомических участков тщательно освобождают от жира и прирезей соединительной ткани. Навеску массой 3-4 г тщательно измельчают ножом на часовом стекле. К навеске измельченного сырья приливают дистиллированную воду в соотношении 1:6 (по массе) и ведут экстракцию на холоде при 0°C в течение 30 мин. Затем центрифугированием при частоте вращения 83 с<sup>-1</sup> в течение 5 мин отделяют осадок. Надосадочную жидкость осторожно декантируют и используют для количественного определения белков.

Осадок количественно переносят в фарфоровую ступку, растирают с песком и приливают солевой раствор Вебера в соотношении 1:6 к первоначальной навеске мышечной ткани. Экстракцию проводят при 0°C в течение 20 мин. По истечении указанного времени экстракт отделяют центрифугированием в течение 10 мин при частоте вращения 83 с<sup>-1</sup>. Надосадочную жидкость декантируют и используют для количественного определения солерастворимых белков, а осадок подвергают обработке.

Далее осадок количественно переносят в термостойкую пробирку, добавляют 10 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия массовой долей 10% и нагревают на водяной бане температурой до 96°C. Полученный раствор после охлаждения центрифугируют при частоте вращения 83 с<sup>-1</sup> в течение

5 мин. Надосадочную жидкость декантируют и используют для количественного определения белков стромы.

*Проведение биуретовой реакции.* Для проведения цветной реакции к 1 см<sup>3</sup> исследуемых растворов белков (фракции: водорастворимая, солерастворимая и щелочерастворимая) добавляют 4 см<sup>3</sup> биуретового реактива. Смесь оставляют в покое при температуре (20±5) °С в течение 30 мин. По истечении времени образования окрашенного комплекса измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 540-560 мкм на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром.

Для того чтобы определить содержание белка в любой из фракций мышечной ткани, нужно снять показания оптической плотности D<sub>1</sub>, найти это значение на оси ординат калибровочного графика и определить соответствующую концентрацию на оси абсцисс.

Массовую долю водо-, соле- и щелочерастворимых белковых фракций (%) определяют по формуле:

$$X=100(c \times V)/m,$$

где *c*- концентрация белка, найденная по калибровочному графику, мг/см<sup>3</sup>; *V*- объем пробы после экстрагирования соответствующей белковой фракции, см<sup>3</sup>; *m*- масса навески мышечной ткани, мг.

Подготовив образцы мышечной ткани определенного вида животных, проведя фракционирование, измерив оптическую плотность, выполняют расчеты и оформляют результаты в виде таблицы:

Образец	Содержание белков						Всего		
	Водорастворимых		Солерастворимых		Щелочерастворимых				
	Мг/г	%	Мг/г	%	Мг/г	%	Мг/г	%	

#### **1.4. Анализ аминокислот в белках мяса на автоматическом аминокислотном анализаторе.**

Состав аминокислот в белках различных мясных продуктов определяют методом ионообменной хроматографии на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-881 (Чехия) или на каком-либо другом. Для разделения аминокислот применяют хроматографическую колонку, заполненную катионообменной смолой, со ступенчатым элюированием тремя натрий-цитратными буферными растворами с различным значением рН (3,28; 4,25; 5,28).



Рис. 2. Аминокислотный анализатор нового поколения

Таблица 7

Буферные растворы для элюирования аминокислот

Состав буферных растворов	pH		
	3,28	4,25	5,28
Лимонная кислота одноводная, г	70,5	282,5	123,0
Соляная кислота (плотность 1190 г/см <sup>3</sup> ), см <sup>3</sup>	61,6	167,5	32,5
Гидроксид натрия, г	40,0	160,0	70,0
Этанол, см <sup>3</sup>	200,0	-	-
Детергент (барий 35), г	10,0	10,0	10,0
Вода, см <sup>3</sup>	До 5000	До 5000	До 5000

*Буферный раствор для нанесения образца (pH 2,2).* 11,6 г хлорида натрия и 0,8 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты растворяют в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Метод включает обязательный предварительный гидролиз белков кислотой или щелочью с целью получения свободных аминокислот. Их затем определяют с помощью ионообменной хроматографии на колонках, заполненных твердым носителем, химически соединенным с заряженными группами, которые обеспечивают электростатическое взаимодействие с исследуемым объектом.

Аминокислоты исследуемого раствора обратимо связываются ионообменником, а затем элюируются буферным раствором, вызывая десорбцию аминокислот. Для элюирования аминокислот используют буферные растворы, pH и ионная сила которых постепенно повышаются. При этих условиях аминокислоты выходят на колонки в следующем порядке: кислые, нейтральные и основные.

Выходящий из колонки элюат поступает в смеситель, содержащий нингидрин, который подается насосом. Для развития цветности в результате качественной реакции смесь проходит через специальный капилляр, погруженный на водяную баню температурой 100°C. Окрашенный раствор пропускают через спектрофотометр с длиной волны 570 нм для измерения интенсивности окраски, которая фиксируется самописцем в виде пиков. По расположению пиков судят о наличии индивидуальных аминокислот в гидролизате, а по площади пиков – об их содержании.

*Подготовка проб.* При определении суммарных аминокислот (свободных и связанных) проводят гидролиз белков и пептидов, содержащихся в мясе. Для этого образец измельченного мяса массой 150-250 мг (белка должно быть не менее 25-50 мг) помещают в стеклянные ампулы или термостойкие пробирки с пришлифованными пробками и добавляют 25 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты молярной концентрацией 6 моль/дм<sup>3</sup>. Затем ампулы запаивают (или плотно закрывают пробирки пробками) и выдерживают в термостате при 114-115°C в течение суток. При этом необходимо помнить, что при кислотном гидролизе триптофан разрушается полностью, серин и треонин – на 5-10%, цистин, цистеин, метионин – частично. Перед гидролизом образцы следует пометить. Приготовленные пробы устанавливают в термостат и оставляют под наблюдением.

На втором этапе по окончании гидролиза образец фильтруют через стеклянный фильтр, испаряют избыток соляной кислоты.

Экстракт мышечной ткани получают также как при определении белков в тканях животных фотометрическим методом без минерализации проб. После упаривания на роторном испарителе сухой остаток растворяют в смеси HCOOH-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O в соотношении 7:5:13 с таким расчетом, чтобы 1 см<sup>3</sup> раствора соответствовал 1,5-2,0 г ткани.

При определении аминокислот в сыворотке крови к 1-2 см<sup>3</sup> образца добавляют равный объем раствора CH<sub>3</sub>COOH молярной концентрацией 0,04 моль/дм<sup>3</sup>, нагревают на водяной бане, доводят до кипения и кипятят 2-3 мин, охлаждают и осадок белка отделяют центрифугированием. Центрифугат сливают и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,1-0,2 см<sup>3</sup> смеси муравьиной, уксусной кислот и воды (7:5:13), нерастворившийся осадок отбрасывают.

*Порядок проведения анализа.* Раствор анализируемого материала объемом 0,5 см<sup>3</sup> вручную или с помощью насоса вводят в колонку и запускают систему. Продолжительность собственно анализа 5-6 ч. Строят аминокрамму.

*Построение стандартной аминокраммы.* Перед хроматографическим разделением опытных образцов для получения стандартной аминокраммы проводят анализ стандартной смеси аминокислот. Молярная концентрация каждой аминокислоты должна быть равна 1 ммоль/дм<sup>3</sup>. Навеску каждой аминокислоты (мг) берут в количестве, численно равном ее молекулярной массе. Берут соответствующую навеску хлорида аммония для получения стандартного пика аммиака, который образуется в гидролизате в результате распада амидов, содержащихся в белках.

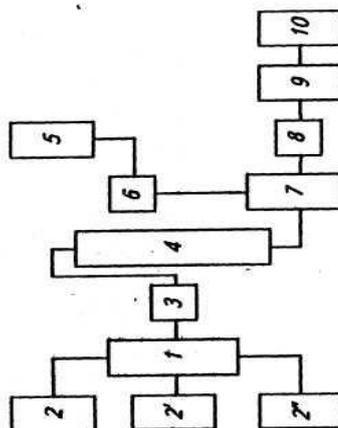


Рис. 3. Схема автоматического аминокислотного анализатора:

1 - система подачи образца; 2, 2', 2'' - сосуды с буферными растворами; 3, 6 - насосы; 4 - ионообменная колонка; 5 - сосуд с раствором нингидрина; 7 - смеситель; 8 - капилляр; 9 - спектрофотометр; 10 - самописец

Изучают полученную аминокрамму. Измеряют площади пиков с помощью потенциометра или вычисляют путем умножения высоты пика на его ширину, взятую на половине его высоты. Массовую долю аминокислот рассчитывают по формуле:

$$X = (S_n M \times 50 \times 10^{-3}) / (S_{cm} m),$$

где  $S_n$  - площадь пика соответствующей аминокислоты на полученной аминокрамме, см<sup>2</sup>;  $M$  - молекулярная масса аминокислоты, Да; 50 - объем раствора. Полученный после кислотного гидролиза, см<sup>3</sup>;  $10^{-3}$  - концентрация аминокислоты в стандартном растворе, моль/дм<sup>3</sup>;  $S_{cm}$  - площадь пика стандартного раствора аминокислоты, см<sup>2</sup>;  $m$  - масса навески образца, г.

Приготовление стандартного раствора аминокислот рекомендуется проводить в соответствии с данными таблицы 8:

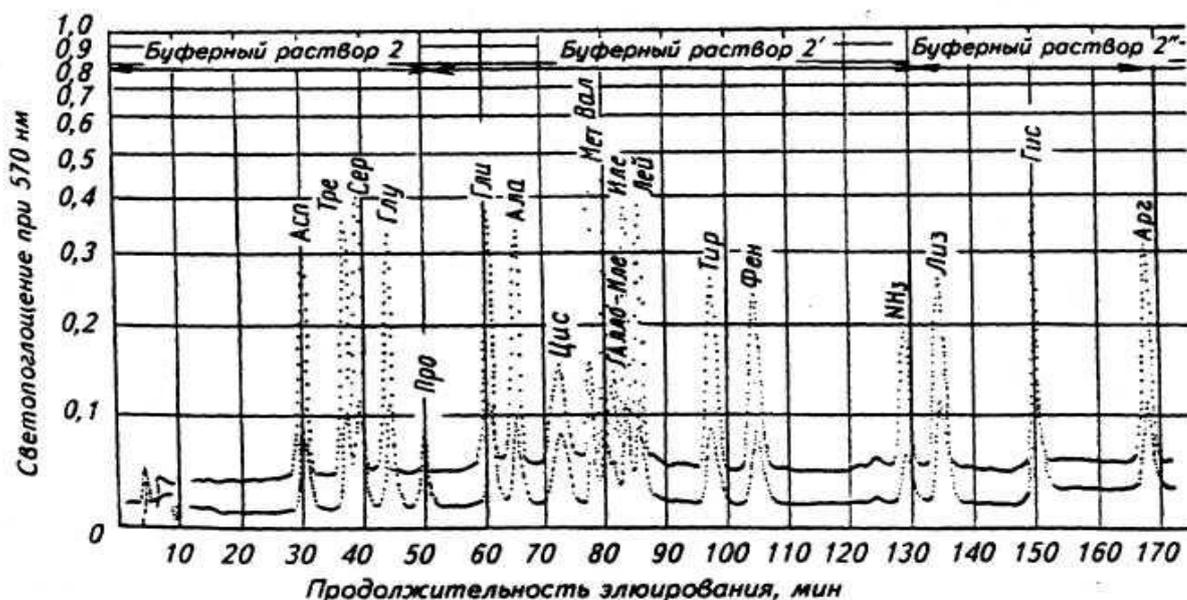


Рис. 1.32. Хроматограмма аминокислот

Рис. 4. Хроматограмма аминокислот

Таблица 8

Характеристика аминокислотного состава мышечной ткани

Аминокислота	Относительная молекулярная масса	Массовая доля азота, %	Содержание в 1 см <sup>3</sup> раствора, мг	
			Аминокислоты	Азота
Лизин	146,13	19,17	0,14613	0,02801
Гистидин	155,19	27,10	0,15519	0,04206
Аргинин	174,24	32,18	0,17424	0,05604
Аспар. К-та	133,12	10,53	0,13312	0,01402
Треонин	119,12	11,75	0,11912	0,01400
Серин	105,09	13,33	0,10509	0,01401
Глут. к-та	147,12	9,52	0,14712	0,01401
Пролин	115,12	12,17	0,11512	0,01404
Глицин	75,05	18,67	0,07505	0,01401
Аланин	89,12	15,73	0,08912	0,01402
Цистеин	121,15	11,56	0,12115	0,01389
Валин	117,09	11,96	0,11709	0,01401
Метионин	149,20	9,39	0,14920	0,01401
Изолейцин	131,20	10,60	0,13120	0,01401
Лейцин	131,20	10,60	0,13120	0,01401
Тирозин	181,19	7,74	0,18119	0,01403
Фенилаланин	165,19	8,48	0,16519	0,01403
Хлорид аммония	53,49	26,16	0,53449	0,01401

Содержание аминокислот в мышечной ткани выражают в микромолях, миллиграмм-процентах на влажную массу ткани или в процентах к небелковому или общему азоту, в сыворотке крови – в микромолях, миллиграмм-процентах или в процентах к небелковому азоту.

Полученные экспериментальные и расчетные данные сводят в таблицу:

Наименование и характеристика образца	Содержание аминокислот в образце	
	Мкмоль/дм <sup>3</sup>	Мг%

Сравнив данные с действующими научно-обоснованными нормами питания, полезно проанализировать потенциальные возможности сырья или продуктов для покрытия суточной потребности в незаменимых аминокислотах, дать рекомендации по рациональному их использованию.

### 1.5. Определение микроструктурных показателей мяса.

Метод разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом мясной промышленности и рекомендован как ускоренный при анализе мяса, который в сочетании с органолептическими показателями позволяет в течение 40-60 мин получить полное представление о состоянии, степени свежести и созревании мяса. В настоящее время внедрен ГОСТ 50372-92 «Мясо. Метод гистологического исследования». Он позволяет раньше, чем физико-химические и биохимические методы, судить об изменениях, происходящих в тканях мяса в процессе прижизненных изменений, технологической обработки и хранения. Результаты гистологического анализа отличаются высокой достоверностью и в ряде случаев могут быть дополнены данными физико-химических, биохимических, органолептических, микробиологических и других исследований.

Процесс гистологического исследования включает в себя следующие основные этапы: *фиксацию образцов; подготовку проб к изготовлению срезов тканей; изготовление срезов (микротомирование); окраску и помещение срезов под покровное стекло; микроскопию готовых препаратов и обработку результатов исследования.*

Микротомирование необходимо для придания анализируемому материалу однородности и скрепления тканей. Обычно для этого используют замораживание (уплотняющая среда – замерзающая вода) или целлоидин. Заключение материала в целлоидин дает возможность получать более тонкие срезы, а также исследовать рыхлые, распадающиеся ткани.

Заключение срезов под покровное стекло предполагает предварительное окрашивание с целью оптического дифференцирования структурных элементов клеток и тканей. Для этого применяют различные

красители, контрастные по цвету и избирательные к различным тканевым структурам.

*Подготовка проб.* Образец размером 30x30x30 мм и массой 40 г вырезают острым ножом из мясной туши перпендикулярно поверхности (в глубь мышц). Каждый образец, избегая сдавливания мышц, маркируют.

Фиксация – обработка материала с целью сохранения тканевой структуры такой, какой она была во время отбора образца, и предотвращения ее дальнейших изменений. Чаще всего для этих целей используют формалин (раствор формальдегида массовой долей 40%). При фиксации материал промывают проточной водой. Это необходимо для удаления формалина перед дальнейшей обработкой, что обеспечивает равномерность дальнейшего окрашивания срезов.

Для быстрой фиксации материала вырезанные из образцов пробы помещают в небольшую колбу или широкую пробирку, заливают четырьмя или пятью объемами нейтрального водного раствора формалина (объемной долей 10-20%) и подогревают на пламени горелки, не доводя до кипения. При появлении пузырьков воздуха подогрев прекращают, содержимое осторожно встряхивают, и подогревание повторяют трижды. Критерием окончательной фиксации проб служит одинаковый серый цвет кусочков как на поверхности, так и в центре. При комнатной температуре для полной фиксации требуется 18-24 ч.

*Порядок проведения анализа.* Из фиксированного материала вырезают небольшие кусочки размером 10x5x4 мм, толщина проб не должна превышать 4 мм, а объем обезвоживающей жидкости должен составлять не менее 15-20см<sup>3</sup> на одну пробу.

Последовательно обезвоживают пробы в растворах этанола объемными долями 50, 70, 96% (два раза) и абсолютном спирте в течение 24 ч, а затем пропитывают раствором целлоидина массовой долей 4-6% (I) в течение 6-10 сут или 8-12% (II) – 3-5 сут.

По окончании пропитывания пробы наклеивают на кубики и уплотняют в парах хлороформа или эфира. Для этого материал из густого целлоидина переносят непосредственно на деревянные кубики (целлоидин берут с избытком) и помещают в эксикатор, куда одновременно ставят одну-две открытые банки с хлороформом. По окончании уплотнения (4-6 ч) блоки переносят для хранения в раствор спирта (70 об.%). Изготавливать срезы из материала, заключенного в целлоидин, желательно через 10-24 ч, но не раньше 3-4 ч после помещения блоков в спирт.

Для ускорения процесса пробы исследуемых материалов толщиной 2 мм фиксируют и одновременно обезвоживают при 37°С последовательно в жидкостях: I - 1 ч, II - 1,5 ч; в абсолютном спирте – 3 ч (первая порция – 1,5ч, вторая – 1,5 ч), в смеси спирта и эфира – 30 мин. Затем пробы при той же температуре погружают в растворы целлоидина массовыми долями 2,6 и 12% на 18 ч каждый. Далее пробы наклеивают на деревянные кубики, подсушивают на воздухе в течение 20-40 мин и погружают для уплотнения в хлороформ на 30-40 мин. Хранят блоки в растворе спирта (70 об.%).

Тонкие срезы готовят на замораживающем микротоме. На столик микротомы кладут пробу мяса и смачивают ее водой из пипетки, выпуская диоксид углерода небольшими порциями, замораживают. Установив регулятор в положении 15 или 30 мкм, приступают к изготовлению срезов в плоскости, параллельной продольной оси мышечных волокон.

Полученные срезы снимают с ножа и переносят в кристаллизатор в водопроводной водой на несколько секунд для расплавления. Под неповрежденный срез быстро подводят предметное стекло, обработанное яичным белком с глицерином для наклеивания, и извлекают срез из воды, удерживая его на середине стекла препаровальной иглой. Затем срез накрывают плотной сухой фильтровальной бумагой (три слоя) и, проглаживая бумагу ребром ладони. Наклеивают срез на предметное стекло. Затем срезы окрашивают, обезвоживают, осветляют и заключают в бальзам под покровное стекло.

Для быстроты и экономии реактивов при окрашивании используют 8 биологических стеклянных стаканов вместимостью 40 см<sup>3</sup> и высотой 90 мм с крышками, закрепленными в штативе. Переносить предметные стекла с наклеенными срезами следует аккуратно, чтобы не перенести раствор из одного стакана в другой. В ходе окраски срезы промывают водой в больших чашках-кристаллизаторах.

*Последовательность окрашивания срезов и время обработки (мин):* гематоксилин Эрлиха – 3-5; водопроводная вода – 1-2; водный или спиртовой (объемная доля этанола 70 об.%) раствор соляной кислоты массовой долей 1% - 5-30; подкисленная аммиаком водопроводная вода (одна капля раствора нашатырного спирта объемной долей 10-25% на 100 см<sup>3</sup> воды – до приобретения срезом синего оттенка) – 2; водный раствор эозина массовой долей 1% - 1; дистиллированная вода – 1; раствор спирта объемной долей 50% - 1, 70% - 1, 96% - 1; карбол-ксилол – 1; ксилол – 1.

Избирательные методы окрашивания – по Ван-Гизону и судану (III или IV).

Для соединительных тканей (метод Ван-Гизона):

Гематоксилин Вейгерта (Эрлиха) 3-5 мин

Водопроводная вода 1 мин

Смесь Ваг-Гизона 5-10 мин

Дистиллированная вода 1 мин

Этанол (96 об.%) 1 мин

Карбол-ксилол 1 мин

Ксилол - 1 мин.

Окрашенные срезы помещают под покровное стекло в пихтовый бальзам. Окрашенные препараты микроскопируют. При этом фиксируют: ядра окрашены в темно-синий, светло-синий, коричневый или лиловый цвет, мышечные волокна и соединительнотканые прослойки (коллагеновые волокна) принимают различные тона красного и розового цвета, протоплазма – желтого цвета.

Для жировой ткани:  
Этанол (70 об.%) 0,5-1,0 мин  
Судан III или IV 5,0-20,0 мин

Окрашенные срезы промывают водопроводной водой (10-30 мин), помещают в гематоксилин Эрлиха (2-3 мин). Перекрашенные в гематоксилине срезы дифференцируют в водном растворе соляной кислоты массовой долей 1% (до розового цвета) и промывают в водопроводной воде (20-30 мин), перекладывают в дистиллированную воду (3-5 мин), извлекают на предметное стекло, наносят капли глицерина или глицерин-желатина и накрывают покровным стеклом.

В результате окраски жир приобретает оранжево-красный цвет, ядра – темно-синий.

#### *Приготовление реактивов.*

*Растворы этанола* (50 и 70 об.%) готовят разведением спирта-ректификата (96 об.%) дистиллированной водой до объема 100 см<sup>3</sup>. Необходимый для разведения объем исходного спирта определяют по формуле:

$$X = a \times 100 / v,$$

где  $a$  – необходимая объемная доля спирта;  $v$  – исходная объемная доля спирта.

*Абсолютный спирт* (100% безводный) готовят из этанола объемной долей 96% путем извлечения из него воды с помощью обезвоженного сульфата меди (выход абсолютного спирта составляет 70%). Для обезвоживания кристаллический сульфат меди прокаливают в фарфоровой чашке, постоянно помешивая, до приобретения им белого цвета (можно пользоваться готовым безводным сульфатом меди). Прокаленный остывший сульфат меди засыпают в банку с широким горлом с раствором этанола (96 об.%) небольшими порциями (5% к объему этанола), а затем подсыпают его в небольшом количестве ежедневно в течение 3-4 сут до тех пор, пока сульфат меди перестанет менять цвет (останется белым). Приготовленный этанол хранят на осадке сульфата меди. Контроль проводят по признакам: порошок сульфата меди в абсолютном спирте не синееет, а при добавлении ксилола спирт остается прозрачным.

*Растворы целлоидина* массовой долей 4-6 и 8-12% готовят из смеси абсолютного этанола и чистого (медицинского эфира) в соотношении 1:1. Используют отмытую от эмульсии кино- или рентгеновскую пленку на нитроцеллулоидной основе. Для заливки материала в целлоидин в лаборатории необходимо иметь набор одинаковых банок с широкими горлами с притертыми пробками. Из них составляют рабочую батарею с растворами этанола объемными долями 50, 70, 96 и 100%, со смесью спирта с эфиром, растворами целлоидина I (массовая доля 4-6%) и II (массовая доля 8-12%).

*Гематоксилин Эрлиха.* 20см<sup>3</sup> раствора гематоксилина массовой долей 10% в растворе этанола объемной долей 96%, 80 см<sup>3</sup> раствора этанола объемной долей 96%, 100 см<sup>3</sup> глицерина, 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 3 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты, 3г алюмокалиевых квасцов помещают в банку с широким горлом вместимостью не менее 500 см<sup>3</sup>, завязывают марлей и оставляют на свету для созревания в течение недели.

*Раствор эозина (массовой долей 0,25-0,5%).* Сухой эозин растворяют в воде или растворе этанола объемной долей от 400 до 70%.

*Карбол-ксилол.* В теплом сосуде смешивают 1 часть кристаллической карболовой кислоты (температура плавления 42°С) с 4-5 частями ксилола (или скипидара).

*Смесь Ван-Гизона.* Смесь гематоксилина Вейгарта с пикрофуксином. Гематоксилин Вейгарта: смеси Вейгарта I и Вейгарта II.

Вейгарт I: раствор гематоксилина массовой долей 1% в растворе этанола (96 об.%).

Вейгарт II: 4 см<sup>3</sup> раствора FeCl<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O массовой долей 50%, 1 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты плотностью 1,15 – 1,19 г/см<sup>3</sup> и 9 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

*Судан III (IV).* К 0,5 г сухого судана прибавляют 100 см<sup>3</sup> смеси, состоящей из раствора этанола (70 об.%) и ацетона, в соотношении 1:1, настаивают несколько дней при комнатной температуре, изредка взбалтывая, фильтруют и хранят в стеклянной таре.

*Обезвоживающая жидкость,* в см<sup>3</sup>: этанол абсолютный – 60; ацетон – 20; хлороформ – 10; эфир – 10.

*Микроскопирование (рис. 5).* При микроскопировании определяют цену деления окуляр-микрометра по формуле:

$$M = ac/v,$$

где *a* – отсчитанное число делений по шкале объект-микрометра; *c* – известное значение одного деления шкалы объект-микрометра (10мкм); *v* – соответствующее число делений шкалы окуляр-микрометра.

Составляют протокол гистологических исследований, в котором приводят зарисовки и характеристику микроструктуры проб. При этом обращают внимание на состояние мышечных волокон, клеточных ядер, соединительнотканых образований, выраженность исчерченности мышечного волокна. Полученные данные сопоставляют с данными органолептической оценки.

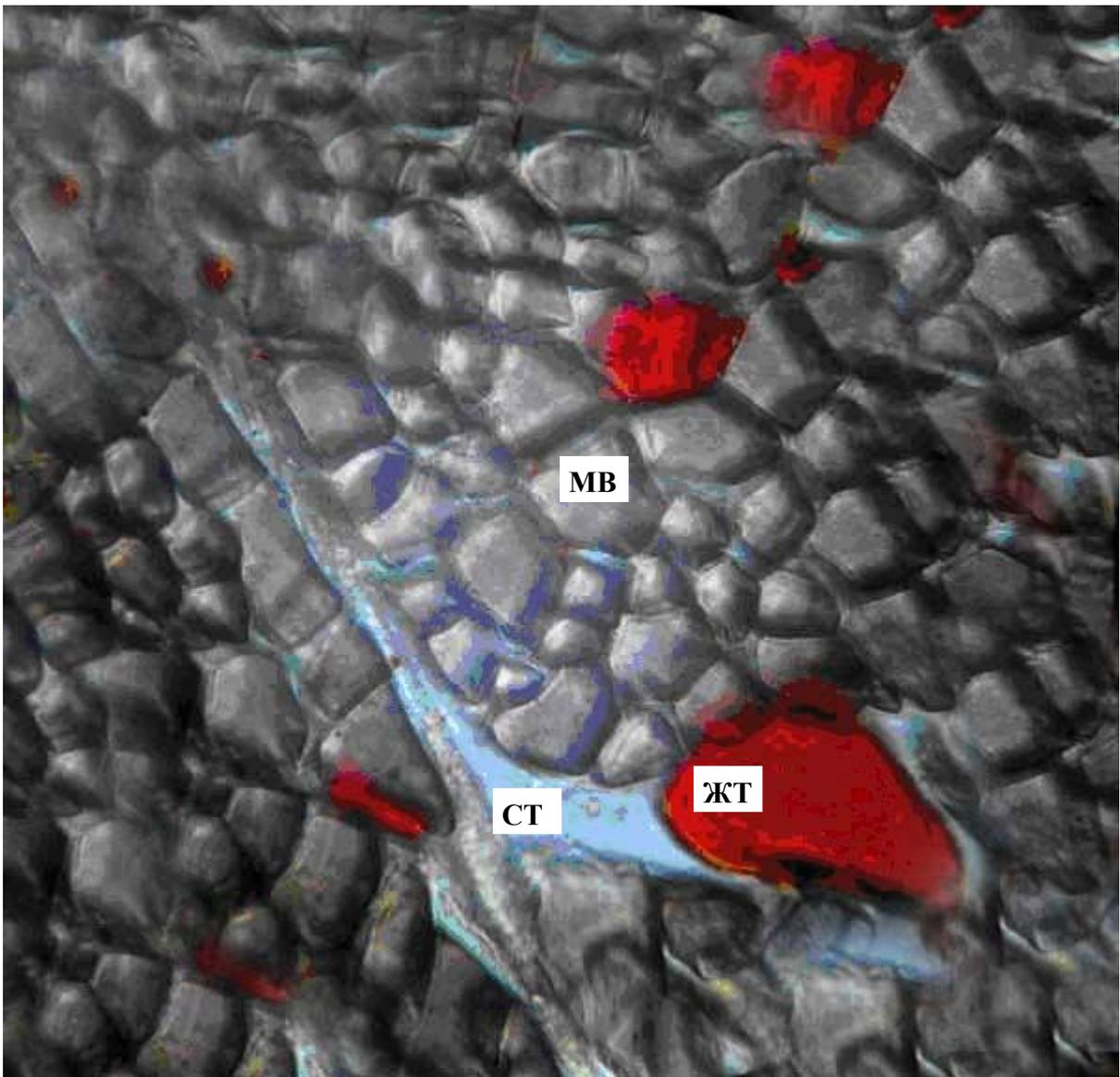


Рис.5. Поперечный срез мышечных волокон свиней породы ландрас: MB – мышечные волокна, ЖТ – жировая ткань, СТ – соединительная ткань.

### **1.6. Определение содержания АТФ в мышечной ткани.**

*Принцип метода:* метод основан на измерении нарастания содержания неорганического фосфата в безбелковом фильтрате после кислотного гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты в течение 7 минут при температуре 100 °С (АТФ предварительно выделяют в виде ртутной соли).

Неорганический фосфор определяют колориметрическим методом Фиске-Суббароу. Суть этого метода заключается в том, что ортофосфорная кислота образует с молибденовой кислотой комплексное соединение, которое легко восстанавливается с образованием окрашенной в синий цвет молибденовой сини.

*Материалы и реактивы:* Мышцы, 10% раствор трихлоруксусной кислоты, 0,5 и 20% растворы ацетата ртути, растворы соляной кислоты (0,1

и 2 моль/л), 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, раствор гидроксида натрия (5 моль/л), 2,5% раствор молибдата аммония в растворе серной кислоты (2,5 моль/л), 0,1% раствор аскорбиновой кислоты, стандартный раствор фосфата (0,1099 г  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  растворяют в мерной колбе в 1 л воды, в 1 л воды, в 1 мл этого раствора содержится 0,025 мг фосфора), кварцевый песок, фильтры.

*Оборудование:* Фарфоровая ступка с пестиком и гомогенизатор, штатив с пробирками, пробирки центрифужные, пробирки мерные (объем 10 мл), центрифуга, водяная баня, ФЭК.

1 г мышц гомогенизированных в гомогенизаторе и растертых в фарфоровой ступке с кварцевым песком при охлаждении переносят в мерную пробирку, доводят раствором трихлоруксусной кислоты до объема 10 мл, перемешивают, оставляют на 30 минут и фильтруют.

К 2 мл фильтрата добавляют 0,5 мкл 20% раствора ацетата ртути, хорошо перемешивают и через 15 минут центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Центрифугат сливают и отбрасывают, а осадок 2 раза промывают 1-2 мл 0,5% раствора ацетата ртути. Затем осадок растворяют в 1 мл раствора соляной кислоты (0,1 моль/л), заливают водой до объема 3 мл, хорошо перемешивают. Затем по 1 мл полученной смеси вносят в две мерные пробирки. В одну доливают 1 мл раствора соляной кислоты (2 моль/л), нагревают на кипящей водяной бане в течение 7 мин, охлаждают, добавляют каплю фенолфталеина и нейтрализуют раствором гидроксида натрия до появления едва заметного розового окрашивания. В обе пробирки вносят по 1,2 мл раствора молибдата аммония и 1 мл раствора аскорбиновой кислоты (в методе Фиске-Суббароу в качестве восстановителя применяется 1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота) доливают водой до метки, перемешивают.

Через 20 минут колориметрируют в фотоэлектроколориметре против контрольной пробы при красном светофильтре. Для приготовления контрольных растворов в мерные пробирки емкостью 10 мл наливают по 0,5; 1 и 2 мл стандартного раствора фосфата и проводят такие же реакции, как и для исследуемых проб.

Рассчитывают массовую долю концентрации фосфора (мг/мл) по формуле:

$$C = aE_{on}V_oV_2/E_{cm}V_1vV_3,$$

где  $C$  - содержание фосфора в исследуемом образце;  $E_{cm}$  - экстинкция стандартного раствора;  $E_{on}$  - экстинкция исследуемого раствора;  $V_o$  - объем исследуемого раствора (10 мл);  $V_1$  - объем исследуемого раствора, взятого для осаждения АТФ (2 мл);  $V_2$  - объем исследуемого раствора, взятого для колориметрирования (1 мл);  $a$  - количество фосфора в 10 мл стандартного раствора (мкл);  $v$  - навеска мышц (г).

## 2. Биологическая характеристика молока

### 2.1. Классификация современных методов определения состава молока. (Посудін Ю.І., Костенко В.І., 1994)

1. *Химические методы* контроля молока построены на использовании химических препаратов, которые дают возможность выделить необходимый компонент из молока и количественно его оценить или получить окрашенный раствор и по интенсивности окраски определить содержание компонента. Для химических методов характерны те же недостатки, что и для традиционных, поэтому в практике определения содержания компонентов в молоке их почти не используют.
2. *Хроматографические методы* связаны с разной растворимостью отдельных компонентов исследуемого объекта и фиксации их перемещения на фильтровальной бумаге. Несмотря на высокую чувствительность, этим методам свойственна длительность процесса определения фракций, кроме того, не исключено влияние других, неизвестных фракций, которые значительно снижают точность измерения.
3. *Электрофоретические методы* базируются на способности заряженных молекул, а конкретно - белков двигаться в растворе при наложении электрического поля. Положительным в этих методах является то, что они дают возможность проводить одновременный анализ белков в смеси, а недостатком - необходимость тщательной калибровки, приготовления и окрашивания геля, длительность процесса измерения.
4. *Термоэлектрические методы* - используется зависимость теплофизических свойств молока от содержания в нем компонентов (например, жира). Методам свойственна большая инерция, которая обусловлена необходимостью нагревания и охлаждения образцов.
5. *Иммунологические методы* базируются на проведении реакции антиген (белок или другая молекула) - антитело (белок). Для методов характерна очень высокая чувствительность; недостатком является длительность процесса измерения.
6. *Радиоактивные методы* основаны на пропускании радиоактивного излучения через образец с последующей ее регистрацией сцинтилляционным счетчиком. При высокой точности измерения и компактности прибора метод имеет ряд недостатков - наличие фонового шума в процессе регистрации и необходимость использования безопасных радиоактивных источников.
7. *Метод ядерного магнитного резонанса* базируется на измерении релаксационных способностей исследуемого образца, который размещают в постоянном и переменном магнитных полях, но перед этим необходима достаточно сложная процедура приготовления образцов для анализа (выделение влаги, добавление солей).
8. *Сверхвысокочастотные (СВЧ) методы* - тут используется зависимость изменения электромагнитных волн СВЧ диапазона от

образца, через который их пропускают. Модификации методов предусматривают измерение диэлектрического проникновения или электропроводности молока в зависимости от содержания в нем компонентов. К недостаткам СВЧ методов следует отнести нелинейную зависимость сигнала, который регистрируем, от содержания компонентов и необходимости согласования образца с волноводным трактом.

9. *Ультразвуковые методы* основаны на измерении скорости распространения ультразвука в молоке. Недостатком, который ограничивает использование ультразвуковых методов, является необходимость строгого соблюдения температурного режима.

10. Оптико-спектральные методы включают рефрактометрический, фотометрический, метод инфракрасной фотометрии и люминисцентные методы:

- *рефрактометрический*, в котором реализуется зависимость показателя преломления света в молоке при постоянной температуре от содержания в нем компонента. Необходимость строгого соблюдения температурного режима, а также использования расчетов показателя преломления ограничивают применение названного метода;

- *фотометрические методы* основываются на сопоставлении света, который поглотили частички молока (абсорбционный метод) или который рассеялся на них (турбидометрический метод), и содержания белка и жира в его составе. К недостаткам методов следует отнести необходимость подсчета процессов взаимодействия света одновременно с частичками белка и с жировыми шариками. Кроме этого, не исключается влияние неидентифицированных компонентов;

- *методы инфракрасной фотометрии* предусматривают количественную оценку поглощения молока в инфракрасной области спектра, где основные компоненты его имеют характерные полосы поглощения: жир - 3,5 мкм и 5,7; белок - 6,5; лактоза - 9,6 мкм. Разновидностью методов можно считать методы спектроскопии отражения в близкой инфракрасной области. Преобладанием в сравнении с другими методами инфракрасной спектроскопии поглощения и отражения является высокая чувствительность и точность измерений, спектральная селективность. К недостаткам можно отнести сложность оборудования, с помощью которых реализуют эти методы, и обусловленную этим обстоятельством необходимость квалифицированного обслуживания;

- *люминисцентные методы* основаны на возбуждении и регистрации флуоресценции красителя, добавленного к молоку. Интенсивность флуоресценции связывают с содержанием белка и жира в молоке. К недостаткам методов, где используется вторичная флуоресценция, можно отнести необходимость работы с красителями, которые усложняют и делают дороже технику измерений.

## 2.2. Характеристики флуоресцирующих компонентов молока

Флуоресцентные характеристики молока и его компонентов измеряют на спектрофотометре СДЛ-2 при комнатной температуре; образцы размещают в стандартных кюветах, предназначенных для жидкостей. Диапазон длины волн, который использовали в процессе измерений, достигал 280-700 нм. Как источник возбуждения применяли лампу ДКеШ-150. Излучения флуоресценции образцов регистрировали под углом  $90^\circ$  по направлению возбуждающего светового потока. При этом использовали метод подсчета фотонов в автоматическом режиме. Как приемник применяли ФЭП-100. Абсолютные ошибки измерений составляли: определение положения максимума линий  $\pm 2$  нм; определение полуширины линии  $\pm 5$  нм. Относительная ошибка при измерениях интенсивности не превышала  $\pm 2,0\%$ . В процессе исследований ширина щели достигала: у монохроматора возбуждения - 2,86, у монохроматора регистрации излучения - 9,6 нм.

Абсорбционные способности белков в значительной степени определяются аминокислотами, входящими в их состав. Область поглощения белков составляет 270-300 нм. Уровень квантового выхода флуоресценции триптофана в составе белков составляет 0,06-0,40. В целом все белки согласно классификации, предложенной Вебером и Тилом (1960) можно разделить в зависимости от их флуоресцентных способностей на два класса. К классу *A* входят белки, которые содержат фенилаланин и триптофан, к классу *B* - те, которые имеют в своем составе все три аминокислоты. Белки класса *A* характеризуются максимумом флуоресценции при 303 нм и квантовым выходом, в 5-7 раз меньшим, чем у свободного тирозина. В белках класса *B* в спектре излучения наблюдаются максимумы и *тирозина*, и *триптофана* или только триптофана. На спектры излучения флуоресценции белков имеет влияние образование водородных связей ОН- группы тирозина и NH-группы триптофана с окружающими их кислотными группами. Собственно этим фактором обуславливается характер флуоресценции белков при комнатной температуре с характерным снижением флуоресценции тирозина и уменьшении максимума флуоресценции триптофана (353-344 нм). В целом положение максимума флуоресценции триптофанового остатка в белке зависит от вязкости и диэлектрической постоянной.

*Тирозин* - аминокислота, абсорбционные способности которой определяются фенольным кольцом, характеризуется спектром поглощения с максимумами при 222 и 275 нм. В водных растворах при комнатной температуре тирозин флуоресцирует; полоса излучения шириной около 34 нм занимает область 303-304 нм при возбуждении флуоресценции при 275 нм, а квантовый выход флуоресценции тирозина достигает 0,21. На положения спектра излучения флуоресценции влияет и температура - при охлаждении до 77 К полоса излучения занимает

область 298-299 нм и в то же время рН среды не влияет на спектральные перемещения флуоресценции.

*Триптофан* - аминокислота, спектр поглощения которой определяется системой соединенных связей индольного кольца и характеризуется двумя максимумами при 218 и 280 нм. При возбуждении флуоресценции на длине волны 280 нм в спектре излучения можно наблюдать максимумы при 289, 308, 334 и 360 нм. Изменение длины волны возбуждения до 313 нм вызывает появление широкой полосы с максимумами при 430 нм. Триптофан флуоресцирует в водных растворах при комнатной температуре. Спектральная область его возбуждения флуоресценции достигает 270-290 нм, или 287 нм. Спектр излучения флуоресценции триптофана шириной около 60 нм занимает область 353-354 нм, или 348-350 нм согласно с максимумом при 348 нм. Квантовый выход флуоресценции составляет 0,2. При снижении температуры до 77 К имеет место смещение спектра излучения в коротковолновую область (325-330 нм). На интенсивность и положение спектров излучения флуоресценции влияют рН среды и состав растворителя.

*Фенилаланин* - аминокислота, которая характеризуется поглощением с максимумами при 258 нм, а спектр излучения флуоресценции (при возбуждении ее при 260 нм) имеет максимумы при 275, 282 и 289 нм. Квантовый выход флуоресценции фенилаланина составляет 0,04. На интенсивность и спектральное положение полосы флуоресценции фенилаланина влияет рН среды, а при охлаждении раствора фенилаланина наблюдается ее смещение в длинноволновую (до 297 нм) область.

Поскольку около 80% всех белковых веществ молока составляет казеин, то есть необходимость ознакомиться со спектральными способностями и этого компонента. Спектры возбуждения (при регистрации излучения при длине волны 350 нм) и излучение флуоресценции (при длине волн возбуждения 290, 295, 300 и 305 нм). Максимум спектра возбуждения находится при 304 нм, полуширина полосы достигает 15 нм. При регистрации на длине волны 400 нм можно наблюдать небольшой максимум при 360 нм, кроме основного максимума при 308 нм.

*Казеин* является главным белком молока, его содержание колеблется от 2,1 до 2,9%. Элементарный состав казеина (в %) следующий: углерод - 53,1; водород - 7,1; кислород - 22,8; азот - 15,4; сера - 0,8; фосфор - 0,8. Он содержит несколько фракций, отличающихся аминокислотным составом (таблица 9, 10), отношением к ионам кальция и сычужному ферменту. В молоке казеин находится в виде специфических частиц, или мицелл, представляющих собой сложные комплексы фракций казеина с коллоидным фосфатом кальция. С помощью электронно-микроскопических исследований установлено, что в свежем молоке казеин содержится в виде мицелл почти сферической формы (рис. 6).

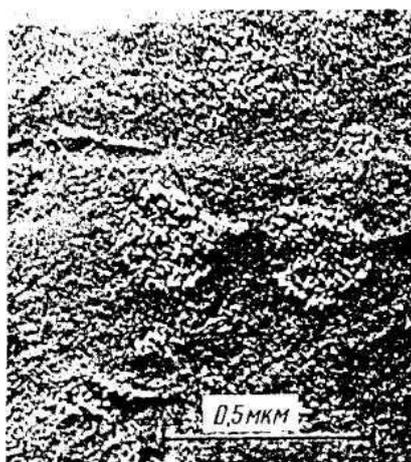


Рис. 6. Частицы казеина под электронным микроскопом

Средний диаметр частиц составляет 70—100 нм (с колебаниями от 50 до 300 нм), молекулярная масса — около  $10^8$ . В свою очередь, казеиновые мицеллы состоят из субъединиц (субмицелл) диаметром 10—20 нм и молекулярной массой 250 000 - 600 000. Субмицеллы представляют собой агрегированные фракции казеина ( $\gamma$ -казеин в состав мицелл не входит), соединенные между собой гидрофобными связями и кальциевыми мостиками. Соединение субмицелл в мицеллы, по-видимому, происходит с помощью фосфата кальция и гидрофобных связей. Предполагают, что на поверхности мицелл располагается  $\chi$ -казеин, имеющий в своем составе углеводные цепи.

Казеиновые мицеллы сравнительно стабильны в свежесвыдоенном молоке. Они сохраняют свою устойчивость при нагревании молока до относительно высоких температур и при его механической обработке (сепарировании, гомогенизации и др.). Стабильность мицелл зависит от содержания в молоке растворимых солей кальция, химического состава казеина, pH молока и других факторов.

Устойчивость коллоидных частиц казеина в молоке обусловлена электрическим зарядом и гидрофильностью. Казеиновые мицеллы на своей поверхности несут положительно и отрицательно заряженные группы с преобладанием последних, т.е. имеют отрицательный суммарный заряд. Отрицательные заряды дают, главным образом, карбоксильные группы сиаловой кислоты (аминопроизводное маннозы), находящейся в конце углеводных цепей  $\chi$ -казеина, а также гидроксильные группы остатков фосфорной кислоты ( $\alpha_s$  и  $\beta$ -казеина).

Между заряженными коллоидными частицами действуют силы взаимного притяжения и отталкивания. Устойчивость коллоидной системы зависит от соотношения этих сил. В свежем молоке силы отталкивания между казеиновыми мицеллами превалируют над силами притяжения, и коллоидная система молока находится в устойчивом состоянии.

Казеин - комплекс четырех фракций. Содержание казеина в молоке составляет 80% ( $\alpha_{s1}$ -Кн - 38%,  $\alpha_{s2}$ -Кн -10%,  $\beta$ -Кн - 39%, $\chi$ -Кн -13%), сывороточных белков - 19%, белков оболочек жировых шариков - 1%.

Кроме того, в молоке содержатся производные, или фрагменты, главных фракций казеина, которые образуются в результате расщепления последних под действием протеолитических фрагментов молока. Так, ранее известные  $\gamma$ -казеины являются фрагментами  $\beta$ -Кн. Например, главный из них  $\gamma_1$ -казеин представляет собой фрагмент  $\beta$ -Кн с 29 по 209-й аминокислотный остаток. Фрагмент  $\beta$ -Кн с 1-го по 28-й остаток раньше относили к протеозо-пептонной фракции. Образование  $\gamma$ -казеинов (и протеозо-пептонов) ухудшает технологические свойства молока, так как при выработке творога и сыра они не свертываются сычужным ферментом и «теряются» с сывороткой. Нормальное свежее молоко содержит около 3%  $\gamma$ -казеинов, однако их количество может повышаться (до 10% и выше) при заболевании животных маститом, в конце лактации, в процессе длительного хранения молока при температуре 2-4 °С и т.д.

Таблица 9

Содержание в полипептидной цепи белка аминокислотных остатков

Аминокислота	Обознач	$\alpha_{s1}$ -Кн	$\alpha_{s2}$ -Кн	$\beta$ -Кн	$\chi$ -Кн
Аланин	Ала	9	8	5	15
Аргинин	Арг	6	6	4	5
Аспараг.кислота	Асп	7	4	4	4
Аспарагин*	Асн	8	14	5	7
Валин	Вал	11	14	19	11
Глицин	Гли	9	2	5	2
Глутам. кислота	Глу	24	25	18	13
Глутамин**	Глн	15	25	21	14
Гистидин	Гис	5	3	5	3
Изолейцин	Иле	11	11	10	13
Лейцин	Лей	17	13	22	8
Лизин	Лиз	14	24	11	9
Метионин	Мет	5	4	6	2
Пролин	Про	17	10	35	20
Серин	Сер	8	6	11	12
Серинфосфат	Сер Р	8	11	5	1
Треонин	Тре	5	15	9	14
<b>Триптофан</b>	<b>Три</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Тирозин</b>	<b>Тир</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>9</b>
Цистеин	Цис	-	2	-	2
<b>Фенилаланин</b>	<b>Фен</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>4</b>
Всего		199	207	209	169

Аспарагин\* - амид аспарагиновой кислоты, Глутамин\*\*- амид глутаминовой кислоты.

## Основные показатели казеина молока

Белки	Содер. в молоке, г/100 мл	Молекулярная масса, тыс	Изоэлектрическая точка, рН среды
$\alpha_{s1}$ – Казеин ( $\alpha_{s1}$ -Кн)	1,2-1,5	23	4,4-4,8
$\alpha_{s2}$ – Казеин ( $\alpha_{s2}$ -Кн)	0,3-0,4	25	-
$\beta$ -Казеин ( $\beta$ -Кн)	0,9-1,1	24	4,8-5,1
$\chi$ -Казеин ( $\chi$ -Кн)	0,2-0,4	19	5,4-5,8

Все фракции казеина являются фосфопротеидами, т.е. содержат остатки фосфорной кислоты (органический фосфор), присоединенные к аминокислоте серину моноэфирной связью (О-Р).

Содержание остатков фосфорной кислоты (серинфосфата) в полипептидных цепях белка определяют его чувствительность к ионам кальция. Доказано, что  $\alpha_s$  и  $\beta$ -Кн наиболее чувствительны к ионам кальция. В их присутствии они агрегируют при образовании кальциевых мостиков и выпадают в осадок.

$\chi$ -Казеин (каппа-казеин) не осаждается ионами кальция и в казеиновых мицеллах, располагаясь на поверхности, выполняет защитную роль по отношению к чувствительным  $\alpha_s$  и  $\beta$ -казеину. Однако  $\chi$ -казеин содержит чувствительную к сычужному ферменту пептидную связь, образованную остатками фенилаланина в положении 105 и метионина в положении 106. Под действием сычужного фермента молекула каппа-казеина распадается на две части: гидрофобный пара- $\chi$ -казеин (аминокислотные остатки с 1 по 105) и гидрофильный макропептид (остатки со 106 по 169).

Некоторые компоненты  $\chi$ -Кн являются гликофосфопротеидами, т.е. кроме фосфорной кислоты содержат углеводные цепи в виде три- и тетрасахаридов (состоящих из галактозамина, галактозы и сиаловой кислоты). Углеводная часть  $\chi$ -Кн присоединена к макропептиду, который называют гликомакропептидом. Гликомакропептиды обладают сильными гидрофильными свойствами и высоким отрицательным зарядом. При действии сычужного фермента они также отщепляются от  $\chi$ -Кн и переходят в сыворотку.

*Физико-химические свойства казеина.* Полярные группы, находящиеся на поверхности и внутри казеиновых мицелл ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{OH}$ ), связывают значительное количество воды - около 3,7 г на 1 г белка. Способность казеина связывать воду характеризует его гидрофильные свойства. Гидрофильные свойства казеина зависят от структуры, величины заряда белковой молекулы, рН среды, концентрации солей и других факторов. Они имеют большое практическое значение.

От гидрофильных свойств казеина зависит устойчивость казеиновых мицелл в молоке (связанная вода образует вокруг казеиновых

мицелл защитную гидратную оболочку). Сильными гидрофильными свойствами обладают макропептиды и гликомакропептиды  $\chi$ -казеина казеиновых мицелл. Поэтому при их отщеплении под действием сычужного фермента (или высоких температур) нарушается гидратная оболочка и уменьшается стабильность казеиновых частиц.

В процессе высокотемпературной обработки молока происходит взаимодействие денатурированного  $\beta$ -лактоглобулина с казеиновыми мицеллами. Сывороточные белки молока обладают большей гидрофильностью по сравнению с казеином, в результате чего повышается его водоудерживающая способность. В свою очередь, гидрофильные свойства казеина влияют на способность кислотного и кислотно-сычужного сгустка удерживать и выделять влагу. Изменение гидрофильных свойств казеина необходимо учитывать при выборе режима пастеризации в процессе производства кисломолочных продуктов и молочных консервов.

От гидрофильных свойств казеина и продуктов его распада зависят водосвязывающая и влагоудерживающая способность сырной массы при созревании сыров, консистенция готового продукта. Следовательно, гидрофильные свойства казеина не только определяют устойчивость белковых частиц в молоке при его обработке, но и влияют на ход некоторых технологических процессов.

Казеин, как и все белки содержит одновременно аминные  $\text{NH}_2$  и карбоксильные  $\text{COOH}$  группы, которые в растворе находятся в виде  $\text{NH}_3^+$  и  $\text{COO}^-$ . Следовательно, казеин обладает свойствами амфотерного электролита. Количество свободных карбоксильных групп в казеине больше, чем аминных, поэтому при рН, близком к нейтральному, он имеет отрицательный заряд.

Таким образом, казеин, содержащий различные реакционноспособные группы, может образовывать целый ряд соединений со многими химическими веществами: кислотами, основаниями, альдегидами, металлами, галогенами и др.

При реакции казеина с формальдегидом происходит блокирование основных аминогрупп, что приводит к увеличению кислых свойств казеина. Эту реакцию применяют при определении содержания белков в молоке методом формольного титрования.

Свободные аминогруппы могут взаимодействовать с альдегидными группами лактозы и других сахаров с образованием аminosахарного комплекса.

Карбоксильные и другие кислые группы казеина вступают в реакции с ионами металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), образуя казеинаты. При йодировании тирозина, входящего в состав белка, образуется йодказеин, который сейчас применяют для ликвидации йодной недостаточности населения.

*Казеинаткальцийфосфатный комплекс, его состав и структура.* В молоке казеин содержится в виде казеинатов кальция, соединенных с

коллоидным фосфатом кальция. Ионы кальция могут присоединяться к карбоксильным группам казеина. Но, вероятно, в первую очередь они взаимодействуют с остатками фосфорной кислоты казеина. При этом кальций может соединяться с одной или двумя ОН-группами кислоты. В первом случае кальций имеет свободную связь и может образовывать кальциевый мостик между расположенными друг против друга серинфосфатными группами двух молекул казеина. Такой кальций играет определенную роль при образовании казеиновых мицелл и называется структурообразующим.

Кальциевые мостики способствуют агрегации коллоидных частиц казеина при сычужной и кальциевой коагуляции.

С серинфосфатным группам казеиновых молекул наряду с ионами кальция может присоединяться коллоидный фосфат кальция молока в виде  $(CaHPO_4)_n$  или  $[Ca_3(PO_4)_2]^*_n$ . Фосфор коллоидного фосфата кальция в отличие от фосфора органического (входящего в состав казеина) называют неорганическим. Фосфат кальция, по-видимому, может соединять молекулы казеина между собой наподобие кальциевых мостиков.

Следовательно, исходя из состава казеина, можно предположить следующее: казеин в молоке содержится в виде сложного комплекса казеината кальция с коллоидным фосфатом кальция, так называемого казеинаткальцийфосфатного комплекса (ККФК). В состав ККФК также входит небольшое количество лимонной кислоты, магния, калия, натрия.

Образование в результате тепловой обработки молока комплекса  $\beta$ -лактоглобулин- $\chi$ -казеин значительно ухудшает атаку  $\chi$ -казеина сычужным ферментом и влияет на термоустойчивость казеиновых мицелл.

#### *Роль казеина в технологии молочных продуктов.*

Коагуляцию белков (с разрушением коллоидной системы молока) можно вызвать различными способами, но любой из них должен сопровождаться снижением отрицательного заряда казеина и переводом его в изоэлектрическое состояние.

При выработке молочных продуктов коагуляцию казеина осуществляют с помощью кислот (кислотная коагуляция), сычужного фермента (сычужная коагуляция) и хлорида кальция (кальциевая коагуляция).

Сущность кислотной коагуляции сводится к нейтрализации отрицательных зарядов казеина положительно заряженными ионами водорода (протонами) кислоты. В промышленности кислотную коагуляцию применяют при выработке кисломолочных продуктов, кислотного пищевого и технического казеина, копреципитатов. Казеин осаждают, главным образом, молочной кислотой, образующейся в результате молочнокислого брожения молочного сахара. При получении казеина и копреципитатов также используют соляную кислоту.

Механизм действия сычужного фермента при сычужной коагуляции заключается в отщеплении от  $\chi$ -казеина отрицательно заряженных гликомакропептидов. Сычужную коагуляцию казеина используют при производстве сыров, творога и казеина. При производстве творога и сыра также применяют совместное осаждение казеина сычужным ферментом и молочной кислотой.

Действие раствора хлорида кальция при кальциевой коагуляции связано со снижением отрицательного заряда казеина под влиянием положительно заряженных ионов двухвалентного кальция. Кальциевую коагуляцию применяют в промышленности для осаждения молочных белков из обезжиренного молока. Коагуляцию хлоридом кальция обычно проводят при высокой температуре (90-95°C), поэтому она называется термокальциевой коагуляцией. Повышенная температура вызывает денатурацию сывороточных белков, которые коагулируют вместе с казеином. Белковый продукт, полученный на основе комплексного осаждения казеина и сывороточных белков, называется молочным белком или копреципитатом. Его используют для обогащения некоторых пищевых продуктов.

Сравнение степени использования белков при различных способах коагуляции, по данным П.Ф.Дьяченко, показывает, что максимальное использование белков (96-97%) обеспечивает кальциевая коагуляция при 90-95 °С, минимальное (85,6%) – сычужная (сычужный фермент не осаждает  $\gamma$ -казеин, и при этом коагулирует лишь небольшая часть денатурированных сывороточных белков).

### **2.3. Выделение и качественный анализ казеина молока.**

(Кугенев П.В., Барабанщиков Н.В., 1988)

*Принцип метода:* Изоэлектрическая точка казеиногена соответствует рН 4,7. В подкисленном растворе (рН 4,7) кальциевая соль казеиногена расщепляется на белок и фосфорную кислоту, которые можно определить по характерным реакциям: белок - по биуретовой реакции; фосфорную кислоту - по реакции с молибденовым реактивом.

*Материалы и реактивы:* Складчатые бумажные фильтры, фильтровальная бумага, сепарированное молоко, 0,1% раствор уксусной кислоты, 0,1% раствор карбоната натрия, 96% раствор этилового спирта, эфир, метиловый спирт, хлороформ, 10% раствор сульфата меди, молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 мл дистиллированной воды и добавляют 100 мл 32% раствора азотной кислоты (плотность 1,21)).

*Оборудование:* Стеклянные палочки, пробирки, пипетки, капельницы, стеклянные воронки, штатив для пробирок, лакмусовая бумага, обратный холодильник, химические стеклянные стаканы, колбы, фарфоровая ступка с пестиком, водяная баня, часы.

*Ход работы:* к 30 мл сепарированного молока, разбавленного в 4 раза, при осторожном помешивании добавляют каплями раствор уксусной

кислоты до прекращения осаждения казеина, который отфильтровывают, промывают водой, вносят в раствор карбоната натрия, чтобы очистить от жира и других веществ. Казеин в растворе карбоната натрия растворяется, а жир находится в эмульгированном состоянии. Смесь фильтруют сквозь влажный фильтр (жир остается на фильтре).

Из фильтрата раствором уксусной кислоты опять осаждают казеин. Осадок отфильтровывают, отжимают между листами фильтровальной бумаги (по возможности досуха) и растирают в ступке с 15-20 мл спирта с целью обезвоживания. Для обезжиривания казеин смешивают сначала с 20 мл эфира, а потом с 20 мл смеси метилового спирта и хлороформа (1:1). Обезжиренный казеин высушивают на воздухе и растирают в порошок, который используют для гидролиза казеина.

В пробирку помещают 50 мг измельченного в порошок казеина и Одоливают 3 мл раствора NaOH. Гидролизуют с обратным холодильником в течение 1 часа, смесь охлаждают и используют гидролизат для реакций на продукты гидролиза.

Для выявления белка в гидролизате в пробирку добавляют 0,5 мл гидролизата, 5 капель раствора NaOH и 1 каплю сульфата меди (проводят биуретовую реакцию). Наблюдают красно-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о наличии белка в гидролизате казеина.

Для выявления фосфорной кислоты к гидролизату (1-2 мл) добавляют 12-15 капель раствора азотной кислоты до слабокислой реакции на лакмус. После этого смесь фильтруют в сухую пробирку, к 0,5 мл фильтрата вносят 2 мл молибденового реактива и кипятят на водяной бане 2-3 минуты. Наблюдают образование желтого окрашивания, а при охлаждении смеси - осадок желтого цвета аммонийной соли фосфорно-молибденовой кислоты.

#### ***2.4. Определение содержания казеиногена в молоке***

Фосфопротеиды - это сложные белки, простетической группой которых является фосфорная кислота, связанная сложноэфирными связями с остатками серина и треонина. Один из фосфопротеидов - казеиноген молока, который содержится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При ферментативном свертывании молока (действие пепсина) казеиноген подвергается химическим превращениям с образованием казеина.

*Принцип метода.* Определение содержания казеиногена в молоке основано на том, что казеиноген имеет кислую реакцию и поэтому разница между объемом раствора, необходимым для нейтрализации собранного молока, и объемом, истраченным на нейтрализацию сыворотки после осаждения казеиногена, - это объем щелочи, который требуется для нейтрализации казеиногена. Зная эквивалентную массу казеиногена, можно определить его количество в молоке.

*Материалы и реактивы:* Складчатые бумажные фильтры, сепарированное молоко, 0,02 моль/л раствор серной кислоты, 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 0,1 моль/л раствор гидроксида калия.

*Оборудование:* Конические колбы, воронки стеклянные, цилиндры мерные, пипетки, бюретки, капельницы.

*Ход работы:* Готовят две колбы (А и Б) объемом 200 мл. В колбу А наливают 40 мл воды и 20 мл молока, в колбу Б - 20 мл воды и 10 мл молока. Затем в колбу А вносят каплями, перемешивая, раствор серной кислоты до выпадения казеиногена в осадок. Фиксируют количество истраченного на титрование раствора серной кислоты, объем которой равен половине объема, добавленного в колбу А.

Раствор в колбе А доливают дистиллированной водой до объема 100 мл и фильтруют в колбу А<sub>1</sub>. Фильтрат, который является сывороткой молока, из колбы А<sub>1</sub> переносят в колбу А<sub>2</sub> в объеме 50 мл. В колбы А<sub>2</sub> и Б добавляют по 1 мл раствора фенолфталеина и титруют раствором гидроксида калия до появления слабо-розового окрашивания. Массовую концентрацию казеиногена в молоке (мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$C=(A-B) f Q/V,$$

где *A* и *B* - объемы (мл) раствора гидроксида калия, истраченные на титрование собранного молока и сыворотки соответственно; *f* - коэффициент поправки на титр 0,1 моль/л раствора гидроксида калия; *Q* - масса казеиногена, эквивалентная 1 мл 0,1 моль/л раствора гидроксида калия (11,315); *V* - объем молока, используемый для анализа (10 мл).

### 3. Анализ яиц

Белок яйца состоит на 85,7% из воды, 12,7 – белков, 0,3 липидов, 0,7 – углеводов, 0,6% - минеральных веществ. Различают пять индивидуальных белков: овальбумин, овомукоид, овомуцин, овокональбумин и овоглобулин. В овальбумин (75% протеинов) входит много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, лейцина и аланина. Белок содержит многие ферменты белкового, липидного, углеводного, энергетического и минерального обменов. Лизоцим, содержащийся в белке, придает ему бактерицидные свойства.

Липиды яичного белка – нейтральный жир, стерины, стериды, фосфатиды и гликолипиды – составляют 1% всех липидов яйца.

Углеводы яичного белка находятся в свободном и связанном состоянии. В нем в пересчете на глюкозу содержится 0,41% свободного сахара. В овальбумине содержится 1,7% маннозы, в овомуцине – 14,9% маннозы и галактозы, в овомукоиде – 9,2% маннозы и галактозы, в овоглобулине – 4,0% маннозы, овокональбумин содержит 2,8% маннозы и галактозы. Основной пигмент овофлавин обуславливает желтовато-зеленую окраску белка.

Белок яйца беднее пигментами, чем желток. По химической природе они являются липохромами и лиохромами. В яичном белке есть некоторое количество небелковых азотистых веществ: азот пуриновых и пиримидиновых оснований, аминокислоты, азот аммиака и следы креатинина.

В состав белка входят некоторые минеральные вещества: кальций, фосфор, натрий, калий, магний, сера, железо.

*Желток.* Средний химический состав желтка курицы следующий, %: вода - 48,7, белки - 16,6, липиды - 32,6, углеводы - 1,0, минеральные вещества - 1,1. Светлый и темный желток отличаются по химическому составу. Так, в светлом желтке около 85% воды, 4,6% белков и 3,8% липидов. В обоих видах желтка приблизительно одинаковое количество углеводов.

Белки желтка представлены вителленином, вителлином, ливетином, фосфовитином. Белки желтка с фосфатидами образуют липопротеидные комплексы.

В яичном желтке находятся такие ферменты, как амилаза, протеиназа, дипептидаза, оксидаза.

### ***3.1. Отбор и составление средней пробы***

(Сергеева А.М., 1984)

Средняя проба яиц, предназначенная для инкубации, берется с учетом однородности исследуемой птицы (порода, возраст, продуктивность, живая масса, однотипность кормления, ухода, содержания). В пробу должны входить яйца, снесенные в одно и то же время дня, лучше в часы наиболее интенсивной яйцекладки, то есть в предобеденное время.

Для оценки качества скорлупы (толщины, прочности) пробу яиц отбирают непосредственно с гнезд и клеток, а не после механического сбора, когда яйца с тонкой скорлупой могут оказаться разбитыми.

Среднюю пробу от партии яиц, предназначенных для инкубации, берут перед отправкой на инкубацию в хозяйствах или в цехе инкубации после приема партии методом случайной выборки из нескольких упаковок. Чем больше взято яиц для анализа, тем точнее средняя проба. Для определения показателей, не требующих вскрытия (масса, форма, плотность, упругая деформация, величина воздушной камеры), следует брать не менее 50 яиц, а требующих вскрытия (индексы белка, желтка, соотношение составных частей, толщина и пористость скорлупы) - не менее 25 яиц; для определения витаминов - не менее 10 яиц.

При более точных исследованиях в условиях малого количества птицы (10-12 голов) среднюю пробу для анализа составляют из всех яиц, снесенных птицей за два дня. Для изучения индивидуальных особенностей птицы яйца анализируют от каждой особи отдельно (не менее трех последовательно снесенных яиц).

Установлено влияние на качество яиц сроков и температуры хранения. Оценку яиц проводят через сутки после взятия пробы, но не позднее пятого дня после снесения. Если пробы хранят не более двух суток, то достаточно их охладить и держать при комнатной температуре (но не выше 20 °С). При хранении свыше двух суток пробы держат при температуре 10-12°С. Отобранные для анализа яйца, укладывают в картонные прокладки и отмечают карандашом порядковый номер, чтобы исключить обезличку яиц.

Оценивать яйца необходимо всегда при одинаковой температуре, например 20 °С, иначе нельзя получить сопоставимые данные.

Просвечивание яиц рекомендуется проводить в темном помещении. Овоскоп устанавливают на такой высоте, чтобы удобно было подносить яйца к его отверстию сверху вниз.

В помещении должен быть рабочий стол шириной не менее 0,8 м и длиной не менее 2 м с темной крышкой и бортиками высотой 5-10 мм; на столе должны свободно размещаться овоскоп, две-три прокладки для яиц. Стол желательно установить так, чтобы можно было работать с одним овоскопом с двух сторон. Для просвечивания яиц можно хорошо приспособить обычный фильмоскоп.

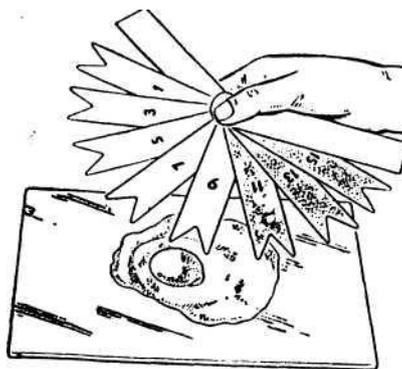
Непригодными для инкубации следует считать яйца, при внешнем осмотре которых обнаруживаются такие дефекты, как неправильная форма (удлиненная, грушевидная, почти круглая); складчатая мятая, грязная и блестящая скорлупа; трещины, насечки, бой, известковые наросты, шероховатые, «мраморные», с утолщениями в средней части яйца; бесскорлупные, очень крупные (двухжелтковые), очень мелкие (часто без желтка). Бракуются также яйца, в которых при просвечивании находят следующие изменения: смещенная, подвижная или увеличенная воздушная камера; наличие кровяных или мясных включений в белке или желтке; очень подвижный желток, не занимающий центрального положения; яйца с признаками начавшегося развития зародыша.

### ***3.2. Определение каротиноидов в желтке по цветной шкале***

Чем интенсивнее окрашен желток, тем больше он содержит каротиноидов, в том числе каротина (провитамина А).

Поэтому при оценке яиц отдается предпочтение яйцам с хорошо окрашенным желтком.

Качественная оценка окраски желтка осуществляется цветной шкалой, состоящей из шести сегментов разной тональности: от бледно-желтого до темно-оранжевого.



№1 (бледно-желтый)	2-5 мкг
№2 (светло-желтый)	7-9 мкг
№3 (желтый)	11-15 мкг
№4 (темно-желтый)	16-20 мкг
№5 (ярко-желтый)	21-24 мкг
№6 (темно-оранжевый)	28-30 мкг

Рис. 7. Шкала для определения каротиноидов в желтке

Цвет каждого сегмента шкалы соответствует определенному количеству каротиноидов (мкг) в одном грамме желтка.

В полноценных яйцах желток имеет темно-желтый цвет, что соответствует номеру сегмента шкалы - 4 и содержанию каротиноидов в одном грамме желтка - 16-20 мкг.

Для анализа берут пробу из десяти яиц. Освобожденный от основной массы белка желток помещают на часовое стекло и при помощи стеклянной пипетки осторожно отсасывают с поверхности желтка белок. Желток с часового стекла переносят на фильтровальную бумагу (или обычную белую бумагу), подносят цветную шкалу, подбирая сегмент соответствующего цвета. Так поступают с каждым яйцом, составляющим среднюю пробу.

Содержание каротиноидов в пробе определяют по среднему показателю. Каротиноиды можно определить и в массе тщательно смешанных желтков. Для этого небольшая часть (одна чайная ложка) желточной массы переносится на белую бумагу и оценку проводят, как описано выше.

Если желток (или смешанная масса) имеет промежуточную окраску, берут среднее из двух показателей смежных сегментов.

Количественный анализ витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и фолиевой кислоты в яйце производится флуорометром ЭФ-3М.

Содержание витаминов А, D и каротиноидов определяют при помощи фотоэлектроколориметра отечественного производства ФЭК-М.

### **3.3. Определение фосфолипидов в желтке** (Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А., 2001)

#### **1. Качественная реакция на лецитин**

Яичный желток выпаривают досуха на водяной бане при температуре кипения. Сухой остаток используют для анализа.

В химический стакан вносят 200-300 мг высушенного и растертого яичного желтка, прибавляют 15 см<sup>3</sup> горячего этанола и все перемешивают. Через 10-15 мин смесь охлаждают и фильтруют в сухую пробирку. В другую сухую пробирку наливают 2-3 см<sup>3</sup> ацетона и по каплям добавляют полученный фильтрат. Наблюдают появление мути, а затем выпадение осадка лецитина, что указывает на нерастворимость лецитина в ацетоне. Если в пробирку к 2-3 см<sup>3</sup> фильтрата прибавлять по каплям дистиллированную воду, то образуется стойкая эмульсия, что позволяет выделить лецитин из смеси липидов.

#### **2. Хроматографическое разделение фосфолипидов**

Для хроматографического анализа фосфолипидов яичные желтки тщательно отделяют от белка, добавляют 400 см<sup>3</sup> ацетона и смесь гомогенизируют в течение 10 мин. Гомогенат оставляют в холоде на ночь. Осадок отделяют центрифугированием с частотой вращения 50 с<sup>-1</sup> в течение 20 мин, суспендируют в 400 см<sup>3</sup> ацетона и снова отделяют центрифугированием. Обработку ацетоном повторяют. Затем осадок наносят тонким слоем на фильтровальную бумагу и сушат до исчезновения запаха ацетона в течение 1-2 ч.

Высушенный порошок заливают 200 см<sup>3</sup> смеси хлороформ - метанол (1:1). Экстрагирование фосфолипидов проводят в течение 30 мин на вибровстряхивателе. Раствор центрифугируют с частотой вращения 50 с<sup>-1</sup> в течение 20 мин. Центрифугат отделяют и сохраняют. Обработку осадка повторяют. Если центрифугирование не дает полного просветления надосадочной жидкости, проводят фильтрование на воронке Бюхнера. Центрифугаты (фильтраты) объединяют и выпаривают на роторном испарителе.

После выпаривания смесь фосфолипидов растворяют в 50 см<sup>3</sup> петролейного эфира и вновь повторяют осаждение. Растворы в петролейном эфире обычно бывают мутными. После повторного осаждения и фильтрования осадок промывают 200 см<sup>3</sup> ацетона прямо на фильтре.

#### **2.1. Разделение фосфолипидов на колонке с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Колонку диаметром 2,5 см и высотой не менее 50 см заполняют на 1-2 сут до разделения фосфолипидов. На дно помещают плотный слой стекловаты толщиной 1 см, затем наливают суспензию, состоящую из 170-190 г Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в смеси с метанолом и хлороформом (1:1). При заполнении следует слегка постукивать по колонке деревянной палочкой для оседания и получения равномерного слоя адсорбента.

Сверху можно положить бумажный фильтр.

Полученную смесь фосфолипидов (10-15 г) растворяют в смеси метанол-хлороформ (1:1) и наносят на колонку. Фосфатидилхолин с примесью лизофосфатидилхолина и сфингомиелина вымывается 500 см<sup>3</sup> смеси метанол-хлороформ (1:1). Первые 150 см<sup>3</sup> и последние 100 см<sup>3</sup> отбрасывают. После выхода фосфатидилхолина колонку промывают 100 см<sup>3</sup> той же смеси. Фосфатидилэтаноламин с примесью фосфатидилсерина отмывается 50 см<sup>3</sup> смеси этанол-хлороформ-вода (5:2:2). Первые 200 см<sup>3</sup> отбрасывают. Оба элюата упаривают на роторном испарителе досуха и получают приблизительно 5 г лецитина (фосфатидилхолина) и 2,5 г кефалина (фосфатидилэтаноламина).

### *3. Колориметрический метод*

К одному яичному желтку добавляют 50 см<sup>3</sup> смеси хлороформа, метанола и воды (2:1:0,8) и экстрагируют при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 30 мин. Центрифугируют 20 мин с частотой вращения 33,3 с<sup>-1</sup> и отделяют органическую фазу, содержащую липиды. Остаток заливают новой порцией растворителя и операцию повторяют еще несколько раз. Липидные фракции объединяют.

Для освобождения от нелипидных примесей экстракт переносят в делительную воронку, добавляют 20% воды от его объема, перемешивают и после разделения водной и органической фаз последнюю переносят в колбу пленочного испарителя и отгоняют испаритель в вакууме. Для высушивания к остатку добавляют 5-7 см<sup>3</sup> безводного бензола, перемешивают и отгоняют бензол, процедуру повторяют несколько раз. Осадок липидов растворяют в точном объеме (5-10 см<sup>3</sup>) свежеперегнанного хлороформа, переносят в пробирку с притертой пробкой и хранят в темноте на холоде.

В пробирку с пришлифованной пробкой помещают 50 нм<sup>3</sup> липидного экстракта (для контроля в пробирку берут 50 см<sup>3</sup> хлороформа) и испаряют на водяной бане. Добавляют 0,2 см<sup>3</sup> концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и нагревают на водяной бане при температуре кипения в течение 10 мин. Пробирки охлаждают, добавляют в них по 2,5 см<sup>3</sup> фосфованилинового реактива, перемешивают и выдерживают при 37 °С в течение 15 мин; колориметрируют против контроля при длине волны 540 нм. Содержание липидов рассчитывают по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика.

В качестве стандартного используют раствор высокоочищенного абрикосового или оливкового масла в хлороформе. Берут аликвотное количество стандартного раствора и готовят разведение в соответствии с чувствительностью метода от 10 до 120 мкг. Затем проводят качественную реакцию согласно описанию метода и колориметрируют при длине волны 540 нм против контроля. После снятия показаний оптической плотности для всех концентраций строят график  $D = f(c)$ , где  $c$  - концентрация липидов.

Студенты выполняют расчеты в соответствии с экспериментальными данными. Результаты оформляют в виде таблицы.

Наименование и Источник образца	Массовая доля суммарных липидов	
	% к массе образца	% к массе абсолютного Сухого вещества

### **3.4. Контроль качества яиц по бактерицидным свойствам белковой оболочки**

Белок яиц обладает весьма мощной бактерицидной активностью в отношении ряда микроорганизмов. Эту способность яичного белка рассматривают как средство защиты зародыша от вредного воздействия внешней среды.

Лизирующим началом белка птичьих яиц, а также тканей животных является лизоцим - вещество белкового происхождения.

Белок яиц различных видов птиц отличается по своей литической активности. В белке яиц водоплавающей птицы лизоцима содержится значительно меньше по сравнению с белком других видов птицы. Наименьшим антибиотическим действием обладает оболочка яиц гусей (таблица 11).

Таблица 11

Содержание лизоцима в белке яиц различных видов птицы

Вид птицы	Содержание лизоцима, мг/мл
Куры	5,71
Цесарки	2,94
Перепелки	2,79
Утки	1,80
Гуси	0,38

Различные слои белка неодинаковы по своим бактерицидным свойствам. Наблюдается тенденция к увеличению лизоцима от наружного слоя к внутреннему (таблица 12).

Таблица 12

Содержание лизоцима в слоях белка кур

Слои белка	Содержание лизоцима, мг/мл
Наружный жидкий	3,94
Наружный плотный	4,76
Внутренний жидкий	9,95
Градинковый	5,44

Подобная закономерность наблюдается и в белке яиц уток. Это имеет важное биологическое значение - чем ближе белок расположен к зародышу, тем значительнее становится защитный барьер, предохраняющий его от проникновения из внешней среды болезнетворных микробов.

Установлена значительная разница в содержании лизоцима в белке яиц между отдельными курами одной и той же линии, что может послужить основой для отбора кур с высокими иммунобиологическими свойствами их яиц.

В настоящее время для определения содержания лизоцима в белке яиц используют два метода: метод диффузии в агаре и турбодиметрический метод.

### **3.5. Методы количественного определения лизоцима.**

#### **а) Метод диффузии в агаре.**

Для исследования готовится 1%-ный агар «Дифко» на 0,06 М фосфатном буфере при рН 6,2. Буфер готовят смешиванием 80 мл 0,06М раствора однозамещенного фосфорнокислого калия с 20 мл 0,06М раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия.

Фосфатный буфер с агаром помещаются в водяную баню для полного расплавления. К 100 мл остуженного до 45-50° агара приливают 5 мл взвешенного в буферном растворе 150 мг ацетонового порошка *Micrococcus lysodeicticus*, хорошо взбалтывают и заливают в чашки Петри слоем в 4 мм. Чашки с агаром помещают на строго горизонтальную поверхность. После застывания агара их ставят в холодильник на 30-50 мин.

Перед работой в агаре делают лунки диаметром 8 мм. Для этой цели используют трубку для пробочника. На обратной стороне чашки лунки нумеруют. Белок разводят в 0,1М растворе хлористого натрия в соотношении 1:100. Предварительно белок, отделенный от желтка, тщательно перемешивают без образования пены.

По центру чашки в четыре лунки вносят 0,1 мл стандартного раствора разной концентрации (для яичного белка - 30, 60, 90 и 120 мкг/мл), оставшиеся лунки заливают по 0,1 мл испытуемой жидкости.

Чашки закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре 37 °С на 20 ч, затем измеряют диаметры прозрачных зон.

Диаметр зоны просветления пропорционален логарифму концентрации лизоцима. Поэтому для построения калибровочного графика используют полулогарифмическую бумагу. По оси абсцисс откладывают концентрацию лизоцима в микрограммах на 1 мл в логарифмическом масштабе, а по оси ординат - диаметр прозрачной зоны (в миллиметрах). Результаты определения активности лизоцима в стандартных растворах наносят на сетку графика и, соединяя точки, получают калибровочную кривую. Пользуясь ею, определяют количественное содержание лизоцима в исследуемых сыворотках.

*б) Определение содержания лизоцима турбодиметрическим методом.*

В качестве тесткультуры используется ацетоновый порошок *Micrococcus lysodeicticus* в виде суспензии в 0,06 М фосфатном буфере рН 6,2. Буфер готовится смешиванием 80 мл 0,06 М раствора однозамещенного фосфорнокислого калия с 20 мл 0,06 М раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия. Буфер можно хранить в холодильнике при 4 °С одну-две недели.

Одновременно готовится стандартный раствор лизоцима. Для этого 10 мг кристаллического лизоцима растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Из этого раствора, содержащего 100 мкг лизоцима в 1 мл, путем дальнейшего разведения готовят рабочие растворы, необходимые для получения калибровочной кривой, например, 2, 4, 6, 8, 10 мкг в 1 мл.

Белок разводят в соотношении 1:1200 в 0,1 М растворе хлористого натрия.

Рабочие растворы лизоцима и испытуемой пробы белка помещают по 1 мл в две пробирки (две параллельные пробы). В две контрольные пробирки вносят по 1 мл воды. Ацетоновый порошок субстрата суспендируют в 0,06 М фосфатном буфере рН 6,2 так, чтобы начальная оптическая плотность суспензии составляла 0,400 (14-14 мг бактериальных клеток на 100 мл буферного раствора). Взвесь стандартизируют на ФЭКе против буфера, используя зеленый светофильтр (длина волны 540 нм), в кюветах с рабочей длиной 10 мм.

После приготовления всех растворов в каждую пробирку добавляют 6 мл бактериальной суспензии с интервалом в 1 мин. Сразу же измеряют оптическую плотность растворов в контрольных пробирках. Через 30 мин при комнатной температуре в той же последовательности измеряют оптическую плотность всех растворов. Отсчет показателей на ФЭКе проводится по красной шкале правого барабана.

Результаты измерения экстинкции наносят на сетку графика, где по оси абсцисс отложена концентрация лизоцима (мкг на 1 мл), по оси ординат - экстинкция.

#### **4. Анализ меда**

(Довгань В.Б., 2005)

Мед - ценный продукт питания, который содержит питательные вещества, играющие важную роль в обмене веществ в организме. Он легче других углеводов выводится из организма, не вызывает раздражения желудочно-кишечного тракта, быстро возобновляет энергетические затраты организма. В состав меда в оптимальных соотношениях входят ферменты, витамины, микроэлементы, кислоты, аминокислоты, гормоны, бактерицидные и ароматические вещества. Мед, который состоит из моносахаридов, легко усваивается, улучшает

пищеварение. В нем содержится большинство витаминов группы В, С, каротина, ферментов, которые препятствуют развитию атеросклероза. По калорийности мед приравнивается к пшеничному хлебу. 100 г меда по пищевой ценности приравнивается к 90 г жирного сыра или 175 г мясного фарша.

Таблица 13

### Органолептические показатели монофлерного меда

Вид меда	Вкус и аромат	Цвет и консистенция	Характеристика кристаллов
Липовый	Приятный аромат, резкий специфический вкус	Светло-желтый, в жидком виде - прозрачно-водянистый	Мелкозернистый, салообразный или крупнозернистый
Гречаный	Приятный, специфический. В составе есть железо	В жидком состоянии темно-красный или темно-желтый	От мелкозернистой до крупнозернистой формы
Подсолнечниковый	Приятный вкус и слабый аромат	В жидком состоянии светло-золотистый	Крупнозернистый, кристаллизуется быстро
Вересковый	Сильный аромат, приятный запах и вкус	В жидком состоянии темный с красноватым оттенком	Тяжело откачивается, для зимовки малопригоден
Каштановый, табачный	Горьковатый вкус	Светлый, иногда - темный	Используется в пищевой промышленности
С белой акации	Приятный вкус, тонкий аромат	Светлый прозрачный	
Пьянящий или отравляющий	Образуется с нектара азалии, рододендрона и других растений в горах Карпат и Кавказа	Светлый	После длительного хранения токсичность меда исчезает

Натуральный мед является продуктом переработки собранного пчелами цветочного нектара, пади и медяной росы. Это сладкий ароматический раствор или закристаллизованная масса разной консистенции и размера кристаллов, с желтым, коричневым или бурым оттенками.

Мед классифицируют по ряду признаков. По происхождению различают мед цветочный (нектарный) и падевый. Цветочный мед пчелы вырабатывают из нектара цветов растений. Он может быть монофлерный (из однородных цветков) и полифлерный (из разных). К монофлерному

меду (таблица) относят гречаный, подсолнечниковый, липовый и другие, к полифлерным - полевой, горный, степной, смешанный.

*Средняя проба* - это часть меда, которая характеризует качество всей партии продукта. Партия - это любое количество меда одного ботанического происхождения и года сбора, однородного по органолептическим и физико-химическим показателям. Жидкий мед сначала перемешивают: среднюю пробу отбирают трубчатым алюминиевым пробоотборником диаметром 10-12 мм, углубляя его на всю высоту тары. Образцы из закристаллизованного меда отбирают коническим щупом (для масла) с прорезью по всей длине. Щуп углубляют на всю толщину продукта, а потом чистым сухим шпателем берут верхнюю, среднюю и нижнюю части меда, который содержится в щупе.

Мед исследуют с разной целью: чтобы отличить цветочный мед от падевого, для определения качества и установления разных фальсификаций.

Во время органолептического исследования определяют цвет, аромат, вкус и консистенцию.

*Цвет меда* зависит преимущественно от природы красителей, которые содержатся в нектаре. На цвет меда влияет его происхождение, время сбора и место произрастания медоносов. В зависимости от цвета различают мед: бесцветный (прозрачный, белый) – белоакациевый, кипрейный, хлопчатниковый, малиновый; светло-желтый – липовый, эспарцетовый, полевой, степной; желтый – горчичный, подсолнечниковый, кабачковый, огуречный, кориандровый, луковый; темно-желтый – гречишный, вересковый, горькокаштановый, табачный, лесной; темный (с разными оттенками) – некоторые падевые меду, цитрусовый, вишневый (совсем черный).

*Аромат* оценивают дважды: до определения и во время определения вкуса, поскольку он увеличивается во время нахождения меда в ротовой полости. Если аромат отсутствует, мед следует подогреть. Пробу меда (около 40 г), плотно закрыть в стакане, поставить на водяную баню (40-45 °С) на 10 мин, потом снимают крышку и определяют аромат. Аромат может быть слабым, нежным, сильным, тонким, с приятным и неприятным запахом. Старый мед мало ароматный, слабый аромат и у подогретого меда.

*Вкус.* Все сорта меда имеют сладкий приятный вкус со слабокислым и слабогорьким привкусом. Допускается слабогорький привкус у горько каштанового, вербного, табачного и падевого медов. Не допускается к продаже мед с кислым, горьким и другими неприятными привкусами.

*Консистенцию* жидкого меда определяют по его водности и зрелости.

*Кристаллизация* (садка) – переход меда из жидкого состояния в кристаллическое, без ухудшения его качеств (выкристаллизовывание глюкозы и полная кристаллизация виноградного сахара) – мед светлеет.

Кристаллизация меда может быть: салообразная – кристаллов не видно; мелкозернистая – размер кристаллов не более чем 0,5 мм; крупнозернистая – размер кристаллов свыше 0,5 мм.

Перемешивание меда во время его кристаллизации способствует измельчению образовавшихся сростков кристаллов, в результате чего увеличивается количество зародышевых кристаллов, и процесс кристаллизации ускоряется.

При 27-32°C мед не кристаллизуется, при 40°C – закристаллизовавшийся мед начинает растворяться – «распускаться». Ускоряет процесс кристаллизации резкие температурные колебания и добавление тростникового сахара. Замедляет процесс кристаллизации плодовый сахар, декстрины и коллоиды, так как делают мед более густым и клейким.

Чтобы избежать кристаллизации в сотах необходимо:

- не оставлять в зимовку сорта быстро кристаллизирующегося меда (горчичный, рапсовый);
- заменить соты, в которых раньше закристаллизовывался мед, на новые или промывать их теплой водой;
- не давать в зимовку рамы с прошлогодним медом;
- перед скармливанием растворить кристаллы (3 части меда : 1 часть воды, нагревают до 50-60°C, перемешивают и несколько часов выдерживают).

Иногда на рынок привозят мед незрелый, но с признаками кристаллизации. Тогда он разделяется на два слоя: жидкий и плотный, причем жидкий слой толще, чем плотный. Этот мед с водностью, более чем 21% в реализацию не допускают. Если жидкий слой значительно меньше, чем плотный, то это свидетельствует о хранении меда в герметичной таре. Такой мед после перемешивания реализовывают.

#### *Определение механических примесей в меде.*

Механические примеси делят на обычные, желательные (пыльца растений) и нежелательные (трупы или частички пчел, личинки и т.д.). Кроме того, они могут быть видимыми и невидимыми. Механические примеси определяют двумя способами:

1. Около 50 г меда растворяют в 50 мл теплой воды. Раствор переливают в цилиндр из бесцветного стекла, видимые механические примеси всплывают на поверхность или оседают на дно цилиндра.
2. На металлическую сетку, расположенную на стакане и имеющую 100 отверстий на 1 см<sup>2</sup>, кладут около 50 г меда. стакан ставят в сушильный шкаф, нагретый до 60 °С. Мед должен профильтроваться без остатка на сетке. Невидимые механические примеси (цветочную пыльцу, дрожжевые клетки, пыль, пепел, сажу) определяют под микроскопом.

В случае загрязнения посторонними частицами (пыль, пепел, опилки, песок, волос) мед выбраковывают.

#### *Определение признаков брожения меда.*

В незрелом меде содержание воды может быть 22%. Это создает благоприятные условия для жизнедеятельности дрожжевых клеток, которые всегда сохраняются в меде. Признаками брожения является активное вспенивание меда, газообразование по всей его массе со специфическим ароматом и вкусом. Мед с признаками брожения к реализации не допускается.

#### *Лабораторные исследования меда.*

##### *Приготовление рабочего раствора меда.*

Для большинства лабораторных исследований готовят раствор меда в соотношении с водой 1:2. В большую колбу вносят 60 г меда и доливают 120 мл теплой (30-40 °С) дистиллированной воды. Тщательно перемешивают до полного растворения меда, а потом охлаждают до 15 °С. Разведенный таким способом мед в практике лабораторных исследований называют «раствором меда». Для количественных биохимических исследований готовят 0,25-10% - ные растворы меда в пересчете на сухое вещество. Количество раствора меда заданной концентрации в пересчете на сухое вещество ( $X_1$ , мл) вычисляют по формуле:

$$X = MB/C,$$

где  $M$  – масса навески, г;  $B$  – количество сухого вещества в меде, %;  $C$  – заданная концентрация меда.

Или:

$$X_1 = X - M,$$

Где  $X_1$  – количество воды необходимое для приготовления раствора меда заданной концентрации, мл;  $X$  – количество раствора меда заданной концентрации в пересчете на сухое вещество, мл;  $M$  – масса навески меда, г.

#### *Пример*

При навеске меда массой 6 г и содержанием 20% следует приготовить 10%-й раствор. У данного меда сухих веществ будет 80% ( $100\% - 20\% = 80\%$ ). Общее количество 10%-го раствора на определенной навеске меда равна  $6,80:10 = 48$  мл.

Чтобы приготовить 10%-й раствор меда, для навески 6 г необходимо взять 42 мл воды ( $48 - 6 = 42$ ).

#### *Определение содержания воды в меде*

Увеличенное содержание воды (более 21%) может быть в незрелом меде, фальсифицированном водой или жидким сахарным сиропом. Такой мед запрещено продавать, так как он быстро сбраживается. Количество воды в меде можно определить с помощью ареометра и рефрактометра.

- *определение водности меда ареометром*

Этот способ основывается на смене густоты раствора меда в зависимости от содержания в нем воды. Чем больше в меде воды, тем меньше его густота. Раствор меда (1:2) переливают в цилиндр и с помощью ареометра определяют густоту. Густота натурального меда в водном растворе не ниже 1,110. По значениям густоты и по таблице К. Виндена (таблица 15) определяют сухой остаток в растворе меда, потом делают перерасчет на неразведенный мед и устанавливают процент воды.

Таблица 15

Таблица К. Виндена для определения сухого остатка  
в растворе меда (1:2%)

Густота	Сухой остаток	Густота	Сухой остаток	Густота	Сухой остаток
1,101	23,91	1,109	25,64	1,117	27,35
1,102	24,13	1,110	25,85	1,118	27,56
1,103	24,34	1,111	26,07	1,119	27,77
1,104	24,56	1,112	26,28	1,120	27,98
1,105	24,78	1,113	26,50	1,121	28,19
1,106	24,99	1,114	26,71	1,122	28,40
1,107	25,21	1,115	26,92	1,123	28,61
1,108	25,42	1,116	27,13	1,124	28,68
-	-	-	-	1,125	29,03

*Пример*

Густота рабочего раствора меда (1:2) при 15°C равна 1,111, что соответствует 26,07% сухого остатка. Поскольку мед был разведен трижды, то сухой остаток неразведенного меда составит  $26,07 \times 3 = 78,21$ .

Количество воды будет  $100\% - 78,21 = 21,79\%$ . К факторам, влияющим на точность показателей, относят:

- 1) температуру раствора меда (определяют при 15°C, при необходимости раствор подогревают или охлаждают);
- 2) наличие механических примесей.

- *определение водности меда рефрактометром*

Метод основан на изменении рефракции (преломления) световых лучей в зависимости от содержания и соотношения сухих веществ воды в меде.

Таблица 16

Содержание воды в меде в зависимости от индекса рефракции, %

Индекс рефракции	Содержание воды	Индекс рефракции	Содержание воды	Индекс рефракции	Содержание воды
1,5044	13,0	1,4925	17,6	1,4810	22,2
1,5038	13,2	1,4920	17,8	1,4805	22,4
1,5033	13,4	1,4915	18,0	1,4800	22,6
1,5028	13,6	1,4910	18,2	1,4795	22,8
1,5023	13,8	1,4905	18,4	1,4790	23,0
1,5018	14,0	1,4900	18,6	1,4785	23,2
1,5012	14,2	1,4895	18,8	1,4780	23,4
1,5007	14,4	1,4890	19,0	1,4775	23,6
1,5002	14,6	1,4885	19,2	1,4770	23,8
1,4997	14,8	1,4880	19,4	1,4765	24,0
1,4992	15,0	1,4875	19,6	1,4760	24,2
1,4987	15,2	1,4870	19,8	1,4755	24,4
1,4982	15,4	1,4865	20,0	1,4750	24,6
1,4976	15,6	1,4860	20,2	1,4745	24,8
1,4971	15,8	1,4855	20,4	1,4740	25,0
1,4966	16,0	1,4850	20,6		
1,4961	16,2	1,4845	20,8		
1,4958	16,4	1,4840	21,0		
1,4951	16,6	1,4835	21,2		
1,4946	16,8	1,4830	21,4		
1,4940	17,0	1,4825	21,6		
1,4935	17,2	1,4820	21,8		
1,4930	17,4	1,4815	22,0		

Чем больше сухих веществ, тем выше индекс рефракции. Мед влажностью до 21% имеет показатель рефракции не ниже 1,4840. Одну-две капли исследуемого меда наносят стеклянной палочкой на нижнюю призму рефрактометра РЛ или РДУ, проверенного по дистиллированной воде. Призмы замыкают. С помощью винта уменьшают границы между светлой и темной зонами с точкой пересечения ниток в окуляре. По шкале отмечают показания прибора. Определения проводят трижды и вычисляют среднее арифметическое. По таблице определяют содержание воды в меде. К факторам, влияющим на точность показателей, относят: 1) точность работы рефрактометра (согласно инструкции); 2) температура меда (определяют при 20 °С, а при температуре выше 20 °С прибавляют 0,00023 на 1 °С, при температуре ниже 20 °С отнимают 0,00023 на 1 °С; 3) наличие кристаллов (закристаллизованный мед нагревают в пробирке с закрытой пробкой при 50 °С, потом охлаждают до 20 °С, воду, собирающуюся на

стенках пробирки и мед перемешивают стеклянной палочкой; 4) присутствие механических примесей.

#### *Определение общей кислотности меда*

Натуральный мед содержит небольшое количество органических (муравьиная, яблочная, лимонная, щавелевая, молочная) и неорганических (хлоридная, фосфатная) кислот.

Общее количество принято выражать нормальными градусами. Это количество миллилитров 0,1н. Раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование 100 г меда.

В колбу вносят 100 мл 10%-ного раствора меда, добавляют 3-5 капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина (1 г растворяют в 70 мл 96%-го спирта и доливают 29 мл дистиллированной воды) и титруют 0,1н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания, которое исчезает через 10 с. титруют дважды. Расхождение результатов не должно превышать  $\pm 0,05$ . Увеличенное содержание кислот – показатель скисания меда и накопления уксусной кислоты или искусственной инверсии сахарозы в присутствии кислот (искусственный мед). Пониженная кислотность возникает вследствие фальсификации меда сахарным сиропом, крахмалом или переработки пчелами сахарного сиропа (сахарный мед). Общая кислотность – нормальные градусы от 1 до 4. Факторы, влияющие на точность показателей: рН дистиллированной воды должна быть 7; нормальность раствора едкого натрия 0,1 н. При длительном хранении нормальность едкого натрия изменяется.

#### *Определение фальсификации меда*

В практике исследований меда известны случаи, когда к натуральному меду добавляют разные примеси: сахар, сахарный сироп, муку или крахмал, сахарную и крахмальную патоку, искусственный и сахарный мед. Чтобы выявить фальсификацию, достаточно взять немного меда в стеклянную посуду, залить дистиллированной водой. Примесь останется на дне посуды или на поверхности раствора. Муку и крахмал легко выявить с помощью йодной пробы. Для этого к раствору меда в дистиллированной воде добавляют 1-3 капли йода. Синее окрашивание раствора свидетельствует о содержании в меде названных примесей. Примесь мела определяют добавлением в 10%-ый раствор меда несколько капель соляной кислоты или уксуса. Наблюдаем вспенивание вследствие выделения углекислоты. Крахмальную патоку в меде легко выявить как по внешнему виду, так и по клейкости и отсутствию кристаллизации. Показательна и такая проба: к 2 мл раствора меда в воде (1:2) добавить 2 капли концентрированной соляной кислоты и 20 мл 95° винного спирта. Образовавшаяся мутность свидетельствует о содержании в меде крахмальной патоки.

О содержании сахарного сиропа (сахара) в меде свидетельствует образование желто-белого осадка при внесении к 5 мл 20%-ного водного раствора меда 2,5 г уксуснокислого свинца и 22,5 мл метилового спирта.

#### *Определение диастазного числа*

Диастазная (амилазная) активность в некоторых видах натурального меда очень низкая (с белоакациевый, липовый, подсолнечниковый).

В случае нагревания меда выше 50 °С и длительного хранения (свыше 1 года) диастаза частично или полностью инактивируется.

Фальсификация меда также приводит к ослаблению активности фермента.

Определение активности диастазы базируется на способности этого фермента расщеплять крахмал на аминокрахмалы. Количественно этот показатель выражают диастазным числом (единицы Готе), что означает количество (мл) 1%-ного раствора крахмала, расщепляющегося диастазой (амилазой), содержащейся в 1 г меда (в пересчете на сухое вещество), на протяжении одного часа при температуре (40±1°С) к веществам, не окрашивающимся йодом в синий цвет. Для этого в 11 пробирок разливают 10%-й раствор меда и другие компоненты, приведенные в таблице 17.

Таблица 17

#### Определение активности диастазы

Компонент	Номер пробирки										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
10%-й р-р меда	1,0	1,3	1,7	2,1	2,8	3,6	4,6	6,0	7,7	11,1	15,0
Дистил. вода	9,0	8,7	8,3	7,9	7,2	6,4	5,4	4,0	2,3	-	-
0,58%-й р-р поварен. соли, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1%-й р-р крахмала	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Диастазное число (ед.ГОСТ)	50	38	29,4	23,8	17,9	13,9	10,9	8,0	6,5	4,4	3,3

Пробирки закрывают резиновыми пробками, тщательно перемешивают и помещают на водяную баню на 1 час при температуре 40°С. Потом их вынимают и охлаждают под струей воды до комнатной температуры, в каждую вносят по одной капле раствора йода (0,5 г йода) 1 г йодида калия в 100 мл дистиллированной воды. В пробирках, где крахмал не расщепился, появляется синее окрашивание, а где крахмал отсутствует - фиолетовое окрашивание. Последняя слабоокрашенная

пробирка перед рядом обесцвеченных (с желтоватым оттенком) отвечает диастазной активности исследуемого меда.

Если растворенного крахмала нет, его можно приготовить: 250 г картофельного крахмала промывают в 1 л дистиллированной воды. После отстаивания воду сливают. В осадок добавляют 1,5 л 4%-го раствора HCl и выдерживают 1-2 часа, смесь фильтруют. Крахмал, собранный с фильтра, многократно промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции (лакмусовая проба) и высушивают при температуре 90 °С. Диастазное число для натурального меда колеблется в разных районах страны, но не должно быть ниже 5. Показатели диастазного числа в странах, областях и районах для натурального меда приведены в таблице 18.

Таблица 18

Диастазное число меда

Страна, область, район	Диастазное число
Украина Днепропетровская и Черкасская обл.	5,0
Все другие области Украины	6,5
Белоруссия Витебская, Минская, Могилевская обл.	8,0
Брестская, Гомельская, Гродненская обл.	10,0
Российская федерация	5,0-23,0
Молдова	1,08
Грузия	6,0
Эстония	5,0
Латвия	10,9
Литва	13,9
Казахстан	5,0-10,0
Узбекистан	10,0

*Определение оптической активности*

Углеводы меда оптически активны, так как способны разворачивать площадь поляризованного света. Цветочный мед разворачивает площадь света влево, а падевый мед и некоторые фальсификаты – вправо. Для определения оптической активности используют поляриметр портативный (типа П-161 или сахаромер универсальный СУ-3). Перед началом измерений прибор юстируют. Потом в камеру вкладывают поляриметрическую кювету (трубку), заполненную профильтрованным 10%-ым раствором исследуемого меда, который изменяет однородность половины поля зрения. Поворачивая кримальеру, выравнивают однородность половин поля зрения и проводят пониусом отсчет шкалы. Показатели шкалы снимают пять раз. Среднее арифметическое пяти измерений будет результатом измерения в целом.

### *Определение содержания минеральных веществ в меде*

Содержание минеральных веществ снижается в меде в случае добавления глюкозы, сахарозы, сахарного сиропа, искусственного инвертированного сахара и сахарного меда. Содержание минеральных веществ у этих фальсификатов ниже 0,1%. В прожаренный до постоянной массы тигель кладут навеску меда 5-10 г (с точностью до 0,01 г), сжигают до черноты на газовой или электроплите. Следует избегать потери веществ в результате выброса пены из тигеля. Затем пробу прожаривают 1 час при 600 °С в муфельной печи. Красный цвет содержимого тигеля указывает на правильность режима прожаривания. Тигель охлаждают в эксикаторе над сульфатной кислотой 30 минут и взвешивают. Общее количество минеральных веществ (X,%) вычисляют по формуле:

$$X=(M_1-M_2)\times 100/M,$$

где  $M$  – навеска меда, г;  $M_1$  – масса тигля с золой, г;  $M_2$  – масса тигля, г.

### *Состав меда и его изменение в процессе хранения*

Основные компоненты зрелого цветочного меда – вода, фруктоза, глюкоза – составляют 90-95% общей массы. В зависимости от соотношения этих компонентов между собой происходит процесс кристаллизации меда. Глюкоза менее растворима в воде (72 г на 100 мл воды при 20 °С). Чем больше глюкозы в меде, тем выше возможность выпадения ее кристаллов.

Фруктоза хорошо растворяется в воде (375 г в 100 мл воды) и не выпадает в виде кристаллов при влажности среды до 10%. В связи с этим мед с высоким содержанием фруктозы (вересковый, горькокаштановый) не кристаллизуется некоторое время, а белоакациевый мед – на протяжении нескольких лет. Содержание фруктозы зависит от вида меда, силы пчелиной семьи, вида источника нектара и климатических условий.

В меде есть и другие сахара: мальтоза, мелицитоза, трегалоза, раффиноза. Органические вещества разных классов есть в меде в меньшем количестве и влияют на процессы кристаллизации.

Мальтоза является хорошим антикристаллизатором глюкозы, мед кристаллизуется медленно при ее содержании 6-9% (липовый, белоакациевый), а при 2-3% намного быстрее (подсолнечниковый, репейный, эспарцетовый).

При высоком содержании мелицитозы в меде выпадают в осадок специфические кристаллы. Много мелицитозы в падевом и горькокаштановом меде, другие сахара в меде содержатся в незначительных количествах и не влияют на процесс кристаллизации. Наибольшее влияние на размер и количество кристаллов в меде оказывает присутствие пыльцевых зерен. Чем больше этих зерен, тем больше центров кристаллизации и меньшие размеры самих кристаллов.

Мед, пропущенный через фильтры из песка или из специальных сортов глины, длительное время не кристаллизуется, поскольку не содержит белковых, слизистых веществ и пылевых зерен.

Процесс кристаллизации, как правило, начинается на границе разделения жидкость-воздух или жидкость-твердое тело. При резких колебаниях температуры воздуха поверхностный слой меда отдает или принимает водяные пары из воздуха. В результате в тонком поверхностном слое возникает много участков богатых глюкозой, в центре кристаллизации растут кристаллы этого союза. Чем больше центров кристаллизации, тем соответственно больше появляется кристаллов глюкозы. Густота кристаллов глюкозы составляет 1,54, а густота меда колеблется от 1,45 до 1,4 в зависимости от содержания воды и вида меда.

Кристаллизация меда – естественный процесс, не изменяющий его пищевых, биологических и питательных свойств. Через 1-2 месяца после откачки меда с наступлением холодов мед может быстро закристаллизоваться. Быстрее всего мед кристаллизуется при температуре 10-15 °С. Кристаллы глюкозы могут иметь разнообразный вид в зависимости от количества центров кристаллизации. Иногда искусственно вызывают мелкозернистую кристаллизацию. Для этого в мед, нагретый полного растворения кристаллов и охлажденный до 14 °С, вносят затравку из мелкозернистого меда, перемешивают и оставляют для кристаллизации при 4 °С на 12-24 часа, а потом выдерживают 10-12 дней при 14 °С.

Сахара в процессе хранения изменяют свой состав. В липовом меде содержание фруктозы во время хранения увеличивается незначительно (0,5-2%), при увеличении глюкозы на 5-6%. В меде происходит не просто ферментативный гидролиз сахарозы, а регулируемый множеством ферментов гидролиз с одновременным преобразованием фруктозы в глюкозу и дальше в мальтозу, трегалозу и другие полисахариды, то есть процесс трансглюкозидации.

Сахара нектара некоторых растений, содержащих 50-80% дисахаридов (сахароза, иногда мальтоза), под действием ферментов разлагаются на глюкозу и фруктозу с поглощением молекул воды, необходимой для гидролиза дисахаридов.

В меде, полученном при больших сборах нектара в слабых и средних семьях, процесс созревания затягивается, и мед не всегда полностью созревает. В первые два месяца хранения содержание в нем сахарозы может полностью увеличиться до 15-20% на сухое вещество, что также может быть признаком добавления в мед товарного сахара. Гидролиз сахарозы в таком меде замедляется из-за меньшего количества ферментов и он полностью созревает только на восьмом месяце хранения при комнатной температуре.

Хранение меда при комнатной температуре (23-28 °С) приводит к исчезновению диастазной активности в месяц в среднем на 2,95%, а за 20 месяцев хранения – свыше 50%. Соответствующий период полураспада ферментативной активности диастазы составляет 17 месяцев.

Снижение диастазной активности меда при 20 °С в месяц составляет 0,72%. Снижение температуры хранения резко снижает потери диастазной активности из-за увеличения вязкости меда и кристаллизации глюкозы.

Ферментативная активность закристаллизованного меда происходит в межкристаллической жидкости и особенно в верхнем жидком слое. Это необходимо знать при хранении меда.

Инвертазная активность меда во время хранения также снижается. Уменьшение температуры хранения на 5-8 °С снижает ферментативную активность на 1/5-1/6 часть первичной активности. Снижение активности отдельных ферментов приводит к тому, что накапливаются продукты неполного гидролиза сахаров.

С начала хранения меда ферменты разрушают сахара до спиртов, альдегидов, кетонов. Но при «старении» некоторых ферментов эта цепочка превращений нарушается, и в меде накапливаются продукты полураспада. Чем дольше хранится мед, тем короче становится цепочка превращения углеводов и все больше накапливается других продуктов. Некоторые из этих продуктов вредны для организма человека (оксиметилфурфурол, фурфурол, другие фурановые и пирановые производные). Например, если в свежем меде содержание оксиметилфурфуrolа 1-5 мг на 1 кг меда, то после 4-5 лет хранения его количество увеличивается до 150-200 мг на 1 кг продукта.

При нагревании меда содержание оксиметилфурфуrolа увеличивается. При дальнейшем хранении прогретого в достаточном режиме меда оксиметилфурфуrol, который накопился в процессе нагревания, разрушается, и содержание этого вещества приобретает уровень, регулируемый ферментами.

Свободные аминокислоты меда в процессе хранения взаимодействуют со многими веществами, а также окисляются, восстанавливаются, поддаются карбоксилированию и дезаминированию. В результате дезаминирования аминокислот образуются такие ароматические вещества, как пропанол 1,3-метилбутанол-1, 2-метилбутанол-1, 1-пентанол, в основе которых соответственно аминокислоты альфа-масляная, лейцин, изолейцин, норлейцин. Фенилаланин является предшественником бетафенилэтанола, при окислении которого появляется фенилуксусная кислота, бензиловый спирт, бензиловая кислота.

Свободные аминокислоты взаимодействуют также с сахарами и образуют меланоиды, придающие меду в коричневые оттенки.

В начальный период хранения кислоты меда – это преимущественно кислоты, попавшие в мед с нектаром. Наибольшее изменение активной кислотности меда происходит в первый месяц его хранения, когда происходят процессы созревания, формирования медового аромата. При последующем хранении кислотность меда увеличивается незначительно. Зольные элементы, красители, которые попали в мед из нектара, не изменяются во время хранения и в меде не синтезируются.

Ароматические вещества являются наиболее лабильными составляющими меда. Ароматические вещества нектара цветков преобразовываются под действием ферментов меда. Они окисляются, возобновляются, гидролизуются, в результате чего образовывается больше новых веществ. Чем дольше хранится мед, тем меньше остается первичных ароматических веществ нектара и все больше появляется производных этих веществ. Аромат меда связан с содержанием свободной аминокислоты фенилаланина. Эспарцетовый и белоакациевый мед имеют тонкий аромат цветов и нежный медовый аромат наряду с высоким содержанием этой аминокислоты.

### **5. Определение общей серы в шерсти** (Rimington C. J.Soc. Chem.Ind., 1930,139 т)

Сера в шерсти почти целиком входит в состав цистина. Установлено, что при нормальном содержании цистина в шерсти, определение общего содержания серы совпадает с суммарным показателем, получаемым на основании отдельных определений входящих в состав шерсти серосодержащих соединений цистина, цистеина, метионина, лантионина, цистеиновой кислоты, серной кислоты, серы, окисляемой бромом. Баланс серы в шерсти становится отрицательным, как только снижается содержание цистина.

Обычно применяемые методы определения серы в шерсти сложны и длительны. Предлагаемый метод Бенедикта-Дениса не является исключением в этом отношении, но обладает высокой точностью, что побуждает остановиться именно на нем.

Сущность метода состоит в том, что серу исследуемого объекта (шерсти) окисляют до сульфатов, а затем определяют, как серноокислый барий.

Реактивы: 1. Реактив Бенедикта-Дениса - 25 г нитрата меди +25 г хлорида натрия + 10 г нитрата аммония, воды - до 100 мл; 2. 1%-ный раствор соляной кислоты; 3. 10%-ный раствор хлорида бария.

Для определения серы берут 0,25 г сухой шерсти. Параллельно навески 0,5 г берутся для определения влажности. Навески шерсти помещают в колбы Къельдаля объемом 50 мл и прибавляют по 10 мл соляной кислоты, разбавленной водой 2:1. Колбы подогревают на электрической плитке до полного растворения шерсти. После этого гидролизат полностью переносят в фарфоровый тигель, прибавляют к нему 10 мл реактива Бенедикта-Дениса, помещают в сушильный шкаф и выпаривают досуха. Затем тигли помещают в муфельную печь и содержимое сжигают в течение 5 минут при 6000 °С. При этом органически связанная сера минерализуется и окисляется до сульфата, который с медью образует сульфат меди. В остывшие тигли прибавляют по 10 мл 10%-ной соляной кислоты и медленно нагревают до полного растворения осадка. Сжигание считается полным, если все частицы

остатка полностью растворяются в кислоте. В дальнейшем раствор фильтруют в стаканчик, а фильтрат промывают несколько раз дистиллированной водой. Стаканчики с фильтратом ставят на электроплитку и нагревают. Затем к фильтрату прибавляют 15 мл горячего 10%-ного раствора хлорида бария и оставляют на ночь для осаждения сульфата бария. Последний фильтруют под вакуумом (используют водоструйный насос) через стеклянный фильтр №4. Фильтр с осадком промывают дистиллированной водой, сушат в сушильном шкафу до постоянного веса и взвешивают. Массу сухого остатка сульфата бария умножают на коэффициент 0,137 и таким образом узнают количество серы в нем в мг. Процентное содержание серы в исследуемой пробе шерсти определяют по формуле:

$$C=(100xA)/B,$$

где  $C$  - содержание серы, %;  $A$  - количество серы в сухом остатке хлористого бария, мг;  $B$  - масса пробы шерсти, мг.

### **Определение серосодержащих соединений в шерсти и их значение (Сачко Р.Г., 1995)**

Общее содержание серы (ее баланс) в шерсти составляют следующие соединения: цистин, цистеин, метионин, цистеиновая кислота, лантионин, сера, окисляемая бромом, сульфаты. Общее количество серы в шерсти колеблется в пределах 2-5% и зависит от многих факторов: породы, возраста, физиологического состояния, условий кормления и содержания. Серосодержащие соединения являются интегральными показателями оценки качества шерсти в целом.

Подготовка образца к анализу: шерсть промывают вручную с применением мыльно-содового раствора (0,3-0,4% соды и 0,3% мыла хозяйственного), карбонизацию проводят в 5%-ном растворе серной кислоты в течение 5 минут, а затем кислоту нейтрализуют кальцинированной содой, шерсть промывают водой и сушат при 105°C и анализируют.

Содержание серосодержащих аминокислот – цистина, метионина, цистеиновой кислоты, лантионина и цистатионина определяют на аминокислотном анализаторе «Биотроник LG 6001» с помощью метода ионной хроматографии.

Установили, что количество серосодержащих соединений преобладает в шерсти летнее-осеннего периода роста, чем ранне весеннего. При длительном хранении шерсти наблюдается увеличение содержания лантионина и уменьшение содержания цистина.

Шерсть с признаками пожелтения характеризуется видоизмененной картиной баланса серы, что выражается в увеличении количества цистеиновой кислоты и лантионина.

Промывка шерсти в традиционном мыльно-содовом растворе сопровождается увеличением в ней количества лантионина на фоне соответствующего снижения количества цистина и баланса серы. Крепость шерсти уменьшается.

Замена мыльно-содового раствора синтетическими моющими средствами бытового назначения является перспективным методом в технологии первичной обработки шерсти, обеспечивает сохранение физической массы шерсти и ее физико-механических показателей.

Карбонизация шерсти приводит к потере белка, снижению содержания цистина, что негативно сказывается на крепости шерстного волокна.

Баланс серы, а особенно количественное определение таких соединений, как цистеиновая кислота и лантионин могут быть использованы как тесты для оценки качества шерсти и применяться на предприятиях по переработке в текстильной промышленности.

## **6. Определение гормонов в тканях.**

### **6.1. Методы определения гормонов в тканях.**

По химической природе известные в настоящее время гормоны разделяют на следующие группы.

1. Производные аминокислот. К ним относятся гормоны мозгового вещества надпочечников - адреналин и норадреналин (катехоламины), а также йодсодержащие гормоны щитовидных желез - тироксин и трийодтиронин (тиронины).

2. Простые белки и пептиды. К простым белкам относятся соматотропин, кортикотропин, пролактин, инсулин, глюкагон, кальцитонин, паратирин.

К полипептидным гормонам относят окситоцин, меланотропин, либерины, статины. В свою очередь полипептидные гормоны делятся на пептидные соединения с открытой цепью (кортикотропин, меланотропин) и циклические (вазопрессин, окситоцин).

3. Сложные белки - гликопротеидные гормоны, содержащие глюкозиды. К этой группе относятся тиротропин, или тиротропный гормон (ТТГ), фоллитропин, или фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютропин, или лютеинизирующий гормон (ЛГ).

4. Стероидные гормоны, куда относятся гормоны коры надпочечников - кортикостероиды (кортизол, кортизон, кортикостерон, альдостерон), гормоны мужских половых желез - андрогены (тестостерон, андростерон), гормоны женских половых желез - эстрогены (эстрадиол, эстрон, эстриол) и гестагены (прогестерон).

В номенклатуре названия гормонов аденогипофиза имеют окончание «тропин», а гормоны гипоталамуса имеют окончание «либерин» и «статин».

## 6.2. Определение инсулина в поджелудочной железе (по Антиповой Л.В., Гловой И.А., Рогову И.А.. 2001)

В клинко-биохимических исследованиях применяют методы качественного и количественного определения гормонов, отклонения в их содержании используют для диагностики заболеваний.

Среди гормонов, синтезируемых поджелудочной железой, наиболее важное значение имеют инсулин и глюкагон. Являясь веществом белковой природы, инсулин реагирует с образованием специфически окрашенных веществ, которые служат качественными реакциями и могут быть использованы для обнаружения его в экстрактах.

Количественное определение инсулина осуществляется химическим, так называемым фибриллярным методом, сущность которого состоит в том, что при нагревании инсулина в кислом растворе при 100°C образуется тиксотропный гель, обладающий сильным двойным лучепреломлением. Путем нагревания в кислой среде при 100°C и последующего охлаждения до -80°C образуется устойчивая фибриллярная модификация инсулина в растворе. Кристаллизующийся продукт, регенерированный из фибрилл, не отличается от исходного инсулина по физическим, химическим и биологическим свойствам.

Метод определения активности инсулина *in vitro* основан на специфической реакции удлинения инсулиновых фибрилл за счет нативного инсулина и определении их массы.

Принцип метода сводится к получению стандартного фибриллярного инсулина, который готовят из кристаллического инсулина активностью 24-25 ИЕ в 1 мг. Заготовленный фибриллярный инсулин используют в качестве затравки при определении нативного инсулина.

Испытуемые растворы инсулина после затравки выдерживают в течение 24 ч при 48°C. За этот срок инсулин осаждается, принимая фибриллярную форму.

Фибриллы отделяют от раствора центрифугированием, затем промывают различными растворителями на центрифуге для очистки инсулина от балластных белков и примесей. Полученный осадок сушат над оксидом фосфора (V) и взвешивают или производят спектрофотометрическое определение суспензии инсулина.

Масса инсулина за вычетом массы добавленного для затравки фибриллярного инсулина соответствует содержанию инсулина в испытуемом растворе активностью 24 ИЕ в 1 мг.

### *1. Качественные реакции на инсулин*

Свежую или замороженную поджелудочную железу тщательно измельчают и экстрагируют подкисленным этанолом на холоде в соотношении 1:10 в течение 10 мин. Для проведения качественных

реакций на инсулин используют фильтрованный экстракт поджелудочной железы.

Для проведения *реакции Геллера* к  $1 \text{ см}^3$  концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом  $45^\circ$  так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей фиксируют образование белого аморфного осадка в виде небольшого кольца.

Для проведения *биуретовой реакции* к  $1 \text{ см}^3$  раствора инсулина добавляют  $0,5 \text{ см}^3$  раствора гидроксида натрия массовой долей 10% и  $0,1 \text{ см}^3$  раствора сульфата меди массовой долей 1%. Фиксируют изменение окраски.

Для проведения *реакции Фоля* к  $0,5 \text{ см}^3$  раствора инсулина добавляют  $0,5 \text{ см}^3$  реактива Фоля и смесь кипятят. Через 1-2 мин термической обработки фиксируют появление бурого или черного осадка сульфида свинца.

Для проведения *реакции Миллона* к  $1 \text{ см}^3$  раствора инсулина добавляют 2-3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Фиксируют красное окрашивание раствора белка или появление белого осадка белка, который при нагревании приобретает красную окраску.

## 2. Количественное определение инсулина

200 г измельченной поджелудочной железы заливают раствором этанола объемной долей 80%, подкисленным серной кислотой до pH 2,0, в соотношении 1:2, смесь перемешивают и экстрагируют в течение 3 ч на вибрационном аппарате, контролируя pH через каждый час экстракции.

Полученную массу фильтруют через два слоя марли, осадок отжимают. Раствор тотчас помещают в стаканы вместимостью  $200 \text{ см}^3$  и центрифугируют в течение 30 мин при частоте вращения  $42-50 \text{ с}^{-1}$ . Если полученный центрифугат недостаточно прозрачен, то его центрифугируют вторично.

После окончания центрифугирования раствор сливают, измеряют его объем и переносят  $150 \text{ см}^3$  в центрифужный стакан, в который добавляют  $2,2 \text{ см}^3$  стандартного раствора фибриллярного инсулина, содержащего 4 мг инсулина активностью 24 ИЕ. Раствор тщательно перемешивают стеклянной палочкой, которую оставляют в центрифужном стакане, и помещают на 24 ч в термостат температурой  $48^\circ\text{C}$ . Затем образовавшийся осадок центрифугируют в течение 45 мин (при  $16 \text{ с}^{-1}$  - 20 мин и при  $3,3 \text{ с}^{-1}$  - 25 мин).

Полученный осадок инсулина для освобождения от балластных белков промывают с последующим центрифугированием четырьмя растворами: первый - смесью, состоящей из  $99 \text{ см}^3$  раствора этанола объемной долей 63%,  $1 \text{ см}^3$  раствора соляной кислоты молярной концентрацией  $1 \text{ моль/дм}^3$  и 1 г хлорида аммония (3 раза по  $2 \text{ см}^3$ ); второй - смесью, состоящей из  $99 \text{ см}^3$  раствора этанола объемной долей 65% и  $1 \text{ см}^3$  раствора соляной кислоты молярной концентрацией  $1 \text{ моль/дм}^3$  (1 раз 5

см<sup>3</sup>); третий - абсолютным ацетоном (2 раза по 5 см<sup>3</sup>); четвертый - смесью, состоящей из 100 см<sup>3</sup> метанола и 1 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> (2 раза по 5 см<sup>3</sup>).

Полученный осадок промывают в центрифужных пробирках вместимостью 15-20 см<sup>3</sup>. Для этого осадок из центрифужного стакана после тщательного перемешивания стеклянной палочкой с 5 см<sup>3</sup> промывной смеси (первый раствор) количественно переносят в центрифужную пробирку. Осадок промывают всеми четырьмя растворами, внимательно следя за сохранностью осадка и полнотой его переноса из центрифужного стакана. При промывке растворами центрифугирование проводят в течение 7-8 мин при частоте вращения 25 с<sup>-1</sup>.

Для спектрофотометрических измерений полученный осадок после последней промывки подкисленным метанолом центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость и тщательно перемешивают с 5 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/дм<sup>3</sup>, содержащей 0,1% хлорида аммония.

Оптическую плотность полученной суспензии измеряют в ультрафиолетовой области спектра. Спектрофотометрические измерения суспензии с толщиной слоя 0,2 мм (кювета с вкладышем) проводят на спектрофотометре при длине волны 275 нм по отношению к растворителю (раствор соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/дм<sup>3</sup> с 0,1%-ным хлоридом аммония). С помощью калибровочного графика по оптической плотности определяют содержание инсулина, а затем производят расчет на 100 г поджелудочной железы.

*Построение калибровочного графика.* Калибровочный график строят по величинам оптической плотности суспензий, содержащих известное количество фибриллярного инсулина.

Пример исходных данных для построения графика по средним величинам трех опытов приведен ниже.

Таблица 20

Нахождение концентрации инсулина по оптической плотности р-ра

Концентрация Инсулина	Оптическая плотность в опытах			
	1	2	3	Средняя
2	0,046	-	0,047	0,047
4	0,082	0,087	-	0,084
6	0,132	0,142	-	0,140
8	0,188	0,192	0,200	0,192
10	0,235	0,243	0,255	0,245
12	0,285	0,294	0,303	0,294
14	0,330	0,342	0,357	0,340
16	-	0,398	0,403	0,400

Для приготовления стандартного раствора инсулина 0,5 г порошкообразного инсулина активностью 24 ИЕ в 1 мг растворяют в 25

см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/дм<sup>3</sup> (рН 2,0). 2 см<sup>3</sup> полученного раствора вносят шприцем в ампулы (длина 23 см, диаметр 4 мм) из молибденового стекла так, чтобы не был смочен оттянутый конец ампул, который запаивают.

Глобулярный инсулин в кислой среде переводят в фибриллярный последовательным воздействием высокой температуры (100°С) и низкой (-78...-80°С). Для этого запаиваемые ампулы с инсулином помещают на водяную баню при температуре кипения и затем быстро переносят в смесь, состоящую из ацетона и сухого льда, имеющую температуру -80°С, где выдерживают 1 мин; при этом раствор полностью замораживается.

Операцию нагревания и замораживания повторяют 8 раз. Запаиваемые ампулы с фибриллярным инсулином можно хранить длительное время.

При приготовлении раствора фибриллярного инсулина для затравки после вскрытия ампулы проводят гомогенизацию, т.е. пропускают гель инсулина через иглу или капилляр длиной 20-25 см 6 раз, затем раствор нагревают в ампуле вместимостью 5 см<sup>3</sup> при 100°С и замораживают при минус 80°С. Гомогенизацию с последующим нагреванием и замораживанием рекомендуется проводить дважды, после чего раствор гомогенизируют еще 2 раза.

Полученный фибриллярный инсулин после разведения раствором соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/дм<sup>3</sup> в соотношении 1:10 используют для затравки исследуемого инсулина.

Для приготовления охлаждающей смеси в термос вместимостью 2,5 дм<sup>3</sup> наливают 1,5 дм<sup>3</sup> технического ацетона, а затем добавляют измельченный сухой лед (до наполнения термоса) После измерения температуры термос закрывают пробкой.

Затем строят калибровочный график по величинам оптической плотности суспензий, содержащих известное количество фибриллярного инсулина; фиксируют результаты количественного определения инсулина в экстрактах поджелудочной железы крупного рогатого скота, свиней (мг на 100 г сырой ткани) из расчета активности инсулина 24 ИЕ в 1 мг.

### **6.3. Определение гормонов щитовидной железы и надпочечников**

Гормоны щитовидной железы представляют собой йодированные производные аминокислоты тирозина. Йод поступает в организм с водой. В тканях щитовидной железы он окисляется, принимает форму молекулярного йода и присоединяется к тирозиновому кольцу, образуя монойодтирозин. Затем в результате полимеризации йодтирозина образуются гормоны щитовидной железы - тироксин и трийодтиронин.

Эти процессы происходят в молекулах тиреоглобулина, содержащегося в дольках железы в составе коллоида. Более 90% органически связанного йода организма выделяется в виде тироксина.

Гормоны щитовидной железы являются йодсодержащими соединениями. При их разрушении образуется йодид калия, который окисляется йодатом калия в кислой среде с образованием молекулярного йода. В результате реакции йода с крахмалом образуется соединение синего цвета.

Адреналин - гормон, синтезируемый в мозговом веществе надпочечниковых желез, по химической структуре является амином-1-(3,4-диоксифенил)-2-метиламиноэтанолом (производным пирокатехина):

При добавлении к раствору адреналина хлорида железа (III) жидкость окрашивается в изумрудно-зеленый цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа.

Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием аденохрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет.

При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

В кислой среде с йодатом калия адреналин образует соединение красно-фиолетового цвета.

Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флуоресцирующие продукты.

Количественное определение адреналина основано на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, возникающего при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина. Входящие в этот реактив соли при взаимодействии с адреналином восстанавливаются с образованием более низких оксидов металлов, комплексы которых окрашиваются в синий цвет.

*Подготовка проб.* Щитовидные железы убойных животных измельчают и высушивают при температуре 70-80°C.

Надпочечники крупного рогатого скота или свиней измельчают и экстрагируют адреналин дистиллированной водой, подкисленной лимонной или щавелевой кислотой из расчета на 1 кг надпочечников 1,5 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды и 9-10 г кислоты. После 2 ч экстракции массу подогревают до 90-95°C для коагуляции белков, которые отделяют фильтрованием или центрифугированием. Фильтрат или надосадочную жидкость используют для качественного и количественного определения адреналина.

#### *Определение тиреоидина по качественной реакции с йодидом калия*

В фарфоровой ступке тщательно растирают 100-200 мг измельченной и высушенной ткани щитовидной железы, переносят в колбу для гидролиза, добавляют 5 см<sup>3</sup> раствора NaOH и 5 см<sup>3</sup> воды. Кипятят на асбестовой сетке в течение 10-15 мин. К 3 см<sup>3</sup> охлажденного гидролизата добавляют раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до кислой реакции на лакмус. После

подкисления приливают 5 капель раствора крахмала и 1 см<sup>3</sup> раствора КЮ<sub>3</sub>. Выделяющийся йод дает синее окрашивание с крахмалом.

### *Определение адреналина надпочечников*

#### *Качественные реакции*

Для проведения *реакции с хлоридом железа (III)* в пробирку вносят 1 см<sup>3</sup> экстракта адреналина, добавляют 1 каплю раствора FeCl<sub>3</sub> массовой долей 1%, перемешивают и наблюдают появление изумрудно-зеленой окраски. Затем добавляют 1 каплю раствора NaOH массовой долей 10% и фиксируют появление вишнево-красного окрашивания.

Для проведения *реакции с диазореактивом* к 1 см<sup>3</sup> раствора сульфаниловой кислоты добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора нитрита натрия массовой долей 5% (смесь диазореактива), 1,5 см<sup>3</sup> экстракта адреналина и 1 см<sup>3</sup> раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> массовой долей 10%. Смесь перемешивают и наблюдают окрашивание раствора в красный цвет.

Для проведения *реакции с йодатом калия* к 0,5 см<sup>3</sup> экстракта адреналина прибавляют 1 см<sup>3</sup> раствора КЮ<sub>3</sub> массовой долей 10%, 10 капель раствора уксусной или ортофосфорной кислоты и смесь подогревают до температуры 60-65°C. Фиксируют появление интенсивного красно-фиолетового окрашивания.

Для наблюдения *флуоресценции продуктов окисления адреналина* к 10 каплям дистиллированной воды добавляют 6 капель раствора гидроксида натрия массовой долей 10% и 6 капель экстракта адреналина. Поместив пробирку перед включенным флуорископом, наблюдают зеленую флуоресценцию продуктов окисления адреналина.

#### *Количественное определение адреналина по Фолину*

Готовят две мерные сухие пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>. В первую вносят 1 см<sup>3</sup> стандартного раствора адреналина, во вторую - 1 см<sup>3</sup> исследуемого раствора, добавляют по 4 см<sup>3</sup> свежеприготовленного раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> массовой долей 10% и по 0,5 см<sup>3</sup> реактива Фолина. Содержимое обеих пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигающий наибольшей интенсивности через 3-5 мин.

Далее объем жидкости в пробирках доводят до метки раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> массовой долей 10%. Содержимое пробирок перемешивают и окраску исследуемого раствора колориметрически сравнивают с окраской стандартного раствора адреналина.

Массовую концентрацию адреналина в исследуемом растворе (мг/см<sup>3</sup>) рассчитывают по формуле:

$$C = C_o E_{on} / E_{cm}$$

где  $C_o$  - массовая концентрация адреналина в стандартном растворе (0,04 мг/см<sup>3</sup>);  $E_{on}$  и  $E_{cm}$  - экстинкция соответственно исследуемого и стандартного растворов адреналина.

## 7. Оценка сыворотки крови

### 7.1. Методы иммуноферментного анализа (ИФА)

в описании Белоусовой Р.В., 1999

(Воронин Е.С., Петров А.М. и др., 2002)

Методы иммуноферментного анализа позволяют определять уровень гуморального иммунитета организма животных и его возможность адекватно реагировать на возбудителей инфекционных заболеваний. В последнее время в диагностике вирусных болезней животных стали применять методы, основанные на использовании в качестве метки антигенов и антител ферментов. Эта группа методов носит название иммуноферментного анализа (ИФА). Среди основных направлений применения ИФА - контроль качества продукции и соблюдение санитарных норм на предприятиях сельскохозяйственной, медицинской и пищевой промышленности.

Иммуноферментный тест применяют в двух вариантах: гистохимической и твердофазном.

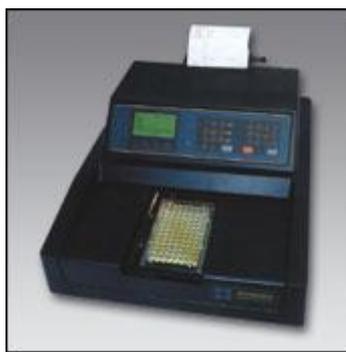


Рис. 9. Иммуноферментный анализатор планшетного типа.

*Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реакция* для постановки реакции используют антитела, меченные не флуорохромом (метод иммунофлюоресценции), а ферментом, и учет результатов реакции проводят не под люминисцентным микроскопом, а под обычным световым. В этом варианте ИФА используют антитела, меченные пероксидазой, так как ее молекулярная масса (40000Д) меньше, чем молекулярная масса щелочной фосфатазы (100000Д) и галактозидазы (150000Д), что способствует лучшему проникновению пероксидазного конъюгата сквозь клеточную мембрану. Кроме того, пероксидаза устойчива при гистологической обработке (Kurstak E., 1971).

Материалом для выявления вирус-специфических антигенов или вирусов с помощью иммунопероксидазной реакции могут служить мазки-отпечатки различных органов, парафиновые срезы, культура клеток, мазки крови. Для инактивации эндогенной пероксидазы применяют натрия азид в сочетании с пероксидом водорода, а также фенилгидразин. Обработку

указанными реактивами проводят перед нанесением иммуноферментного конъюгата на препарат. Иммунопероксидазную реакцию ставят в прямом и непрямом вариантах.

*Методы твердофазного ИФА* основаны на применении антител (антигенов), фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей используют стеклянные и нейлоновые шарики, полистироловые или керамические пробирки и микропанели. Применение полистироловых микропанелей и автоматизация процесса постановки и учета реакции позволяют за короткое время исследовать большое число образцов сывороток на наличие антител.

Фирмы «Дайнатек» (Швейцария) и «Флоу» (Англия) выпускают комплекты приборов для проведения иммуноферментного анализа на полистироловых микропанелях. Основная часть комплектов - оснащенные микрокомпьютерами вертикальные спектрофотометры, позволяющие проводить измерение оптической плотности продукта ферментативной реакции непосредственно в лунках микропанелей. Считывание результатов 96 анализов занимает всего 1 мин; измеряющие, промывающие и дозирующие устройства указанных приборов позволяют проводить анализ как в лабораториях, так и в полевых условиях.

Для крупных клинических центров разработаны полностью автоматизированные установки для проведения твердофазного ИФА, в котором антигены (антитела) адсорбционно фиксируются на поверхности полистироловых пробирок. Данные системы, которые обслуживают 2 человека, позволяют анализировать до 4000 проб ежедневно.

При отсутствии специального оборудования учет результатов ИФА может эффективно проводиться на струйных спектрофотометрах, флуориметрах, фотоэлектрокалориметрах. Достоверность результатов анализов при этом несколько снижается и уменьшается число проб, которое могло бы быть проанализировано за рабочий день.

Часто ценной является качественная информация о наличии или отсутствии данного соединения в исследуемой пробе. В этих случаях учет результатов ИФА можно проводить визуально, по появлению окрашенного продукта ферментативной реакции. Эта особенность метода крайне важна при необходимости массовых исследований вдали от стационарных лабораторных центров.

## **7.2. Определение соматотропного гормона (СТГ) в сыворотке крови крупного рогатого скота методом радиоиммунологического анализа (РИА).**

*Радиоиммунологические методы исследования* удачно сочетают в себе метод специфичности иммунологической реакции с высокой чувствительностью изотопного анализа. Метод основан на уменьшении связывания антителами радиоактивного меченого антигена за счет добавления немеченого антигена. Содержание последнего определяют по

степени уменьшения такого связывания. В качестве связывающего агента используют антитела, а в качестве лиганда - антигены.

Метод используется для определения содержания гормонов в организме животного.

Для проведения радиоиммунологического анализа необходимо иметь соответствующие антисыворотки и меченые антигены. Взаимодействие антигена с антителом представляет собой обратимую реакцию с образованием комплекса антиген-антитело.

Количество гормона в биологических жидкостях определяют по калибровочной кривой, для построения которой предварительно подбирают рабочую концентрацию связывающего агента – концентрацию антител, при которой связывается приблизительно 50% метки. Для построения калибровочной кривой проводят инкубацию фиксированных количеств меченого антигена и антител с различными концентрациями и немеченого стандартного гормона.

Практическую работу по подбору условий проведения радиоиммунологического анализа и построение калибровочной кривой начинают с разведения меченого лиганда буферным раствором, содержащим, как правило, бычий сывороточный альбумин (БСА) – 1-2 мг/мл. Разведение осуществляют до концентрации меченого гормона, составляющей 10-20000 имп/10с в 100 мкл раствора. Установив рабочее разведение для меченого лиганда, приступают к подбору рабочего разведения для связывающего агента (антисыворотки) путем двукратных разведений нативной антисыворотки с последующей инкубацией каждого разведения с меченым гормоном в рабочей концентрации. Для разведения антисыворотки используют чаще всего 0,05М фосфатный буфер (рН 7,5), содержащий 1-2 мг/мл БСА. После инкубации разделяют свободный и связанный лиганд одним из способов, описанных ниже, пробы радиометрируют. Разведение антисыворотки, которая связывает 50% меченого лиганда выбранной концентрации, является рабочим титром.

Для построения калибровочной кривой готовят серию разведений стандартного гормона с таким расчетом, чтобы центральная часть калибровочной кривой соответствовала концентрации определяемого гормона (это соответствует наибольшей чувствительности и точности метода). В дубликаты пробирок приливают затем равное количество (обычно по 100 мкл) нужных разведений стандартного гормона. Одну пару пробирок используют в качестве нулевой пробы (концентрация исследуемого гормона в ней равна 0), а другую пару – в качестве холостой пробы (в нее добавляют впоследствии антисыворотку). Затем в каждую пробирку добавляют равное количество связывающего агента в рабочем разведении. Пробы инкубируют (условия инкубации зависят от вида лиганда и в каждом конкретном случае их специально подбирают). После инкубации связанный и свободный лиганд разделяют одним из описанных ниже способов и осадки радиометрируют. Полученные результаты выражают в виде графика, который строят, откладывая по оси ординат

процент связанной метки либо отношение между связанным и свободным лигандом, а по оси абсцисс – концентрацию стандарта. Определив для неизвестного образца процент связанной метки, по калибровочной кривой находят концентрацию исследуемого гормона. График калибровочной кривой строят либо в арифметической шкале концентрации стандартов, либо используют полулогарифмический способ построения кривой. Оба способа построения просты и наглядны.

Следует помнить, что наклон кривой графиков с использованием арифметической шкалы концентрации стандартов не отражает экспериментального различия между двумя соседними концентрациями стандарта. Количество стандарта желательно выражать в виде концентрации, а не абсолютного количества на пробу, так как в противном случае могут всегда возникнуть недоразумения, связанные с конечным объемом.

### Определение СТГ

Ввиду сильно выраженной видовой специфичности СТГ у человека и домашних животных наборы, предназначенные для определения этого гормона у человека, непригодны для исследований у сельскохозяйственных животных. Поэтому для РИА необходимо самостоятельно получить антисыворотку к СТГ того вида животного, у которого будет впоследствии определен уровень гормона.

Для РИА необходимо самостоятельно получить антисыворотку к СТГ того вида животного, у которого будет впоследствии определен уровень гормона.

Таблица 21

Схема анализа соматотропина

Реагент	Кол-во Реагента в пробир , мл				
	T	H	B <sub>0</sub>	B <sub>СТ</sub>	B <sub>x</sub>
Буфер	0,7	0,7	0,6	0,5	0,5
Стандартная проба	-	-	-	0,1	-
Исследуемая сывор.	-	-	-	-	0,1
Антисыворотка	-	-	0,1	0,1	0,1
<sup>125</sup> I – СТГ	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Инкубируют</i>	<i>72 ч</i>	<i>при 4°С</i>			
Полиэтиленгликоль	-	0,9	0,9	0,9	0,9
Сыворотка лошади	-	0,1	0,1	0,1	0,1

*Антисыворотку к СТГ крупного рогатого скота получают иммунизацией кроликов очищенным СТГ крупного рогатого скота, эмульгированным в полном адьюванте Фрейнда (1мг гормона в 0,5 мл физиологического раствора эмульгируют в 0,5 мл адьюванта).*

Одновременно делают 30 внутрикожных инъекций СТГ с интервалом 21 день. Через 2 недели после каждой иммунизации определяют титр антител в сыворотке крови методом Аухтерлони или с помощью реакции преципитации меченого  $^{125}\text{I}$  СТГ с антителами.

В качестве антигена можно использовать без дополнительной очистки препараты Национального института (США) и многие препараты, полученные из Института технологии кровезаменителей и гормональных препаратов.

В качестве стандартов можно применять отечественные препараты, проведя дополнительную очистку их хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе или препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле 10%-ной концентрации.

При йодировании гормона в реакционный сосуд вносят 1 мКи  $\text{Na}^{125}\text{I}$  и 5 мкг СТГ в 25 мкл 0,5 М фосфатного буфера (рН 7,4). После быстрого смешивания добавляют 50 мкг хлорамина-Т в 10 мкл фосфатного буфера, смесь энергично перемешивают в течение 20 с, затем туда вносят 100 мкг натрия метабисульфита. Йодированный гормон и свободный йод разделяют на колонке (180x16 мм) с сефадексом G-75. Вытекающий из колонки элюат собирают по 1 мл в пробирки, содержащие буферный раствор с 2% альбумина из сыворотки лошади. Для дальнейшей работы отбирают фракцию гормона, дающую наибольшую радиоактивность с избытком антител. Для выбранной фракции устанавливают рабочее разведение антисыворотки, которое связывает 50% меченого гормона, разведенного до концентрации 20000 имп/мин в 100 мкл раствора.

Реакцию преципитации обычно ставят в стеклянных пробирках. Очень важным моментом метода является правильный выбор белкового компонента буферной системы. Вместо сывороточного альбумина человека можно добавлять альбумин из сыворотки крови лошади, который можно получать самостоятельно в большом количестве.

Для отделения комплекса антиген-антитело от несвязанного лиганда можно использовать полиэтиленгликоль с молекулярной массой 3000-6000 Д.

Работу проводят при комнатной температуре. Осаждение связанного лиганда будет наиболее полным при рН 7,0-8,0 и насыщении пробы полиэтиленгликолем до конечной концентрации 12,8% и концентрации в ней белка до 1 мг/мл.

*Проведение анализа.* В пробирки последовательно вносят в параллелях:

1. 0,5 мл 0,05М миналового буферного раствора (рН 8,6), содержащего 0,025 М ЭДТА, 0,01% мертиолата и 1% альбумина из сыворотки лошади;
2. 0,1 мл исследуемой сыворотки ( $V_x$ ) или стандартного гормона ( $V_0$  и  $V_{ст}$ );
3. 0,1 мл антисыворотки в рабочем разведении;

4. 0,1 мл йодированного гормона в рабочем разведении (приблизительно 1,5-1,6 нг);
5. пробы инкубируют 72 ч при 4°C;
6. прибавляют по 0,9 мл 25,6%-ного раствора полиэтиленгликоля и 0,1 мл сыворотки крови лошади;
7. пробирки тщательно перемешивают и центрифугируют 20 мин при 3000 об/мин;
8. надосадочную жидкость декантируют и измеряют радиоактивность осадка на гамма-счетчике;
9. для автоматического расчета концентрации гормона готовят пробы на общую активность (Т) и неспецифическое связывание (Н) – для учета неспецифического связывания меченого гормона стенками пробирки. Для этого в дополнительные пробирки Т и Н добавляют в дубликатах по 0,7 мл буфера и 0,1 мл меченого  $^{125}\text{I}$  соматотропина. После этого пробы Т готовы для счета, а в пробирки Н после инкубации вносят по 0,9 мл полиэтиленгликоля и 0,1 мл сыворотки лошади. Перемешивают, исключая Т-пробирки, центрифугируют 20 мин при 3000 об/мин, надосадки декантируют и определяют в них радиоактивность.

*Расчет результатов.* При машинной обработке результатов на счетчике фирмы ЛКБ концентрацию гормона рассчитывают автоматически по калибровочной кривой. При использовании счетчиков, не предназначенных для машинной обработки, полученные результаты требуют самостоятельного расчета. Для этого необходимо:

- найти среднее арифметическое значение скоростей счета  $^{125}\text{I}$  СТГ для каждой пары пробирок;
- рассчитать величину  $V/V_0 \times 100\%$  для каждой калибровочной и неизвестной пробы, где V – средняя скорость счета в пробах, содержащих калибровочные или неизвестные образцы;  $V_0$  – скорость счета в пробирках, содержащих нулевую калибровочную пробу – 0 нмоль/л;
- рассчитать отношение  $V_0/T \times 100\%$ , где T- общая активность  $^{125}\text{I}$  СТГ. Значение  $V_0/T$  должно быть не менее 35%;
- в линейных координатах построить калибровочную кривую, откладывая по оси ординат значение  $V/V_0 \times 100\%$ , а по оси абсцисс – концентрацию калибровочных проб соматотропина в моль/л. Для неизвестных проб сыворотки на основании соответствующих значений  $V/V_0 \times 100\%$  по калибровочному графику определить концентрацию соматотропина.

При статистической обработке результатов РИА обязательно вводят такие показатели, как процент выхода гормона и воспроизводимость метода внутри одного опыта и между разными сериями опытов.

Процент выхода гормона рассчитывают при определении известных количеств стандартного гормона, добавленного к сыворотке (к

плазме), не содержащей этот гормон. Если компоненты, присутствующие в плазме сыворотки, не мешают анализу определяемого гормона, выход его по отношению к добавленному количеству составляет  $100 \pm 5\%$ .

Воспроизводимость РИА оценивают при определении концентрации гормона в контрольном образце (например, в смешанной плазме, полученной от нескольких животных), в 10-12 параллельных пробах в одном опыте или в 2-3 параллельных пробах не менее чем в 5-6 разных сериях опытов. В оптимальных условиях воспроизводимость результатов в одном опыте составляет не менее 95%, а между опытами – 90%.

Исследования СТГ у животных могут служить контролем при выяснении причин отставания в росте, а также при применении стимулирующих средств при откорме животных.

При определении РИА СТГ у бычков обнаружена положительная корреляция между уровнем среднесуточного прироста массы и концентрацией СТГ в крови.

У бычков черно-пестрой породы в 1,5 мес уровень СТГ в крови находится в пределах  $8,3 \pm 1,1$  нг/мл; в 2,5 мес –  $8,1 \pm 1,5$ ; в 3,5 мес –  $8,7 \pm 1,7$ ; в 4,5 мес –  $8,2 \pm 1,2$ ; в 6,5 мес –  $9,0 \pm 2,1$ ; в 8,5 мес –  $9,7 \pm 1,8$ ; в 10,5 мес –  $8,8 \pm 1,2$ ; в 13,5 мес –  $7,3 \pm 1,5$  нг/мл.

*Видовые различия аденокортикотропного гормона (АКТГ)* незначительны: у овцы и быка он имеет одинаковое строение; у человека и овцы гормоны различаются расположением амидных группировок в 25-м и 33-м положениях; в АКТГ свиней в 31-м положении присутствует лейцин вместо серина. Поэтому для определения данного гормона у сельскохозяйственных животных пригодны наборы, выпускаемые различными фирмами, предназначенные для определения кортикотропина у человека.

*Определение фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)* – фоллитропина проводят в одно и то же время, так как уровень ФСГ подвержен изменению в сыворотке крови с частотой, равной 15 мин. Базальные величины получают на основании трех проб сыворотки, взятых с интервалом 15 мин. ФСГ имеет выраженную видовую специфичность у человека и животных. Аналогичные антигенные свойства имеет ФСГ у крупного рогатого скота и овец, а также у человека и обезьян. Для определения ФСГ у овец и крупного рогатого скота можно использовать в качестве стандарта и меченого лиганда бычий ФСГ. Для определения гормона у свиней и птиц необходимо пользоваться соответственно свиным и птичьим очищенным фолликулостимулирующим гормоном.

*Лютеинизирующий гормон (ЛГ)* – лютропин обладает видовыми различиями в антигенных свойствах, связанных с бетта-цепью, хотя и менее выраженными, чем у ФСГ. Хорошие результаты дают системы для определения ЛГ у овец и крупного рогатого скота, так как ЛГ этих животных проявляет одинаковые антигенные свойства.

*Пролактин, или лактогенный гормон (ЛТГ)* обладает выраженной видовой специфичностью. Пролактин быка и овцы не конкурирует с пролактином человека за связывание с антисывороткой к пролактину человека. Поэтому наборы, выпускаемые рядом фирм для определения пролактина человека, непригодны для определения этого гормона у сельскохозяйственных животных. Пролактины овцы и крупного рогатого скота не обладают видовыми антигенными различиями и имеют сходное по аминокислотному составу строение.

*Тестостерон – мужской половой гормон* определяют стандартными наборами, выпускаемыми различными фирмами (в том числе «Риа-Маттестостерон» ФРГ), у любого вида сельскохозяйственных животных, учитывая полное отсутствие видовой специфичности у стероидных гормонов.

*Окситоцин, вазопрессин, глюкагон, тиреоидные гормоны (трийодтиронин, тироксин)* не обладают видовой специфичностью и это позволяет использовать медицинские тест-наборы для определения этих гормонов в сыворотке крови.

Видовые различия *тиреотропного гормона (тиреотропина)* связаны с бетта-цепью; так, например бетта-цепи ТТГ человека и быка различаются расположением 22 аминокислот. Очень важно отметить, что бетта-субъединица ТТГ обуславливает не только биологические, но и иммунологические свойства гормона. Однако биологические свойства ТТГ проявляются только после соединения альфа- и бетта-субъединиц. Последняя выступает в роли активатора гормона, альфа-цепь не имеет видового различия у таких животных, как крупный рогатый скот и овцы.

*Тиреокальцитонин* – гормон, вырабатываемый клетками фолликулярного эпителия щитовидной железы. В настоящее время разработан метод радиоиммунологического определения кальцитонина у человека, свиньи, овцы и лососевых рыб. Бычий и овечий кальцитонины по химическому строению очень близки свиному и практически полностью совпадают между собой. Овечий кальцитонин отличается от бычьего лишь заменой фенилаланина на тирозин в 22-м положении. Что касается кальцитонина человека и свиньи, то они отличаются между собой расположением 18 аминокислотных остатков. Видовые различия молекул кальцитонина связаны с 10-32-м участком полипептидной цепи. Именно он является носителем иммунологической активности. Синтетический фрагмент свиного кальцитонина 10-32-й и фрагмент кальцитонина человека 11-32-й почти полностью сохраняют способность реагировать со специфическими антисыворотками.

Сравнительный анализ *инсулина*, полученного от животных разных видов и человека, показал незначительные отличия в аминокислотной последовательности этих молекул в 8-10-й позициях цепи А и 30-м положении цепи В. Это позволяет использовать тест-наборы, предназначенные для определения уровня инсулина у человека, для исследования у животных.

### 7.3. Количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови, молоке и молозиве методом радиальной иммунодиффузии в геле

(по Манчини, 1965, в модификации О.Н.Грызловой, П.А.Емельяненко, М.Н.Тулуповой, 1976).

*Принцип метода.* Антиген, внесенный в лунку агарового слоя, содержащего специфические антитела, диффундируя в агаре, образует кольцо преципитации. Диаметр колец увеличивается до тех пор, пока весь внесенный в лунку антиген не будет связан в геле антителами. Величина преципитата отражает количество антител в геле, эквивалентное концентрации антигена, внесенного в лунку. Площадь преципитата, или квадрат диаметра кольца, прямо пропорциональна количеству внесенного в лунку антигена и обратно пропорциональна концентрации антител в агаре. При этом между концентрацией испытуемого антигена и площадью преципитата имеется линейная зависимость. Как показали исследования Mancini и соавт., прямая пропорциональность между площадью преципитата (или квадратом диаметра) и концентрацией антигена устанавливается лишь после прекращения роста колец. Это время различно для разных антигенов и зависит от их молекулярной массы.

Уже через 1 час после начала диффузии можно получить линейную зависимость между диаметром колец преципитации и логарифмом концентрации.

*Реактивы:*

1. свежеперегнанная дистиллированная вода;
2. фосфатный буфер 0,03М растворы натрия фосфорнокислого двузамещенного и калия фосфорнокислого однозамещенного, содержащие 0,1М раствор натрия хлористого. С этой целью 10,74 г натрия фосфорнокислого двузамещенного ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ) и 5,84 г натрия хлористого помещают в мерную колбу, растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до 1 л. Подобным же образом готовят раствор из 4,08 г калия фосфорнокислого однозамещенного ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) и 5,84 г натрия хлористого. Растворы под контролем потенциометра смешивают в соотношении, обеспечивающем рН буфера 8,0. Буфер хранят при комнатной температуре в стеклянном сосуде с притертой или резиновой пробкой;
3. агар фирмы «Дифко» (США), или «Серва» (Германия), или дальневосточный, предварительно очищенный в 0,2М вероналовом буфере (рН 8,56);
4. набор специфических иммунных сывороток с известным титром антител к IgG, IgM и IgA крупного рогатого скота;
5. стандартный препарат с известным содержанием IgG, IgM и IgA крупного рогатого скота;

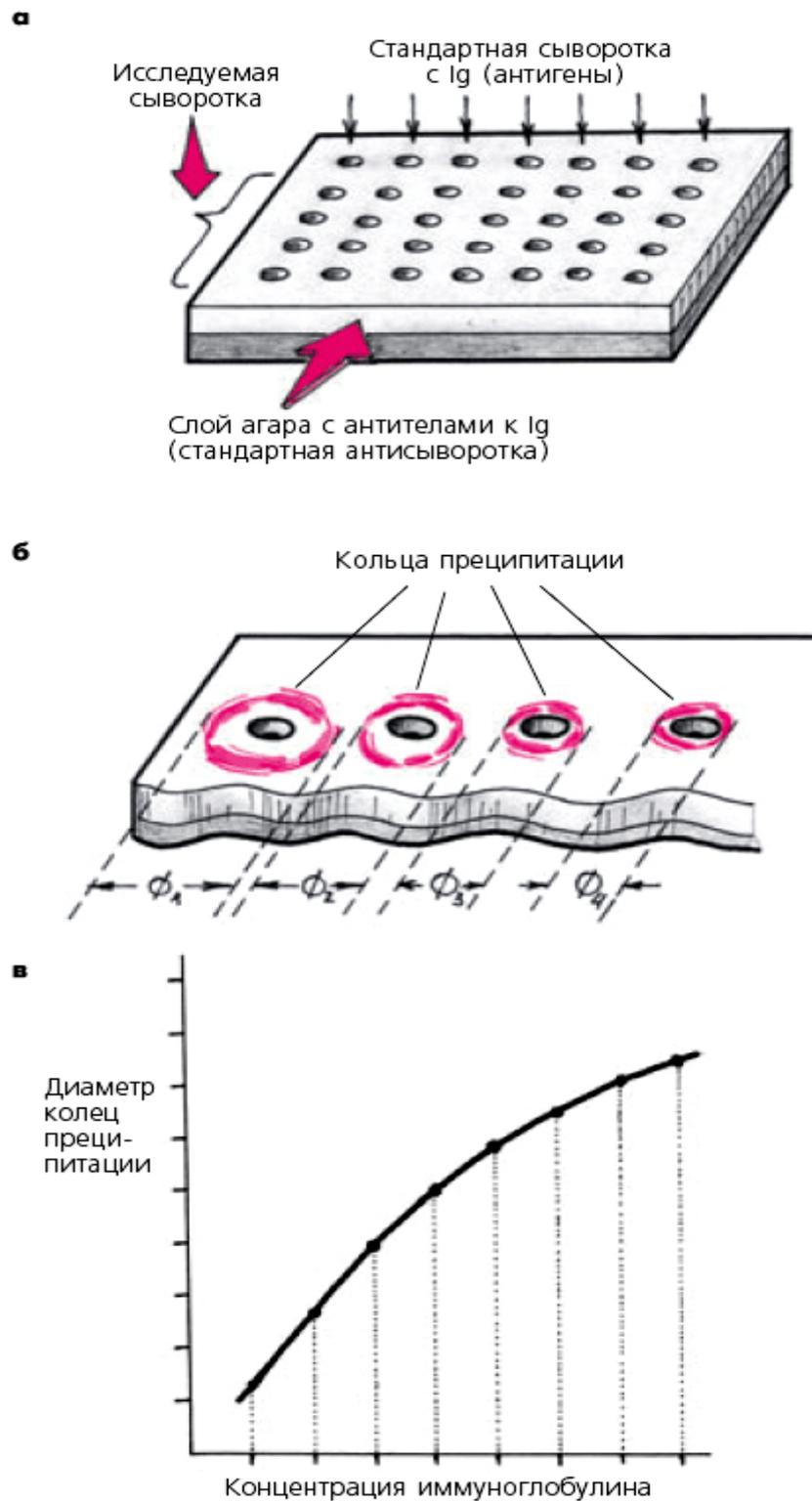


Рис. 10. Схема определения концентрации иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии

*а* - внесение стандартной и исследуемой сыворотки в лунки пластины с залитым агаром, содержащим антитела к иммуноглобулинам, *б*- фрагмент пластины после инкубации (видны кольца преципитации, диаметр которых зависит от концентрации иммуноглобулинов), *в* - калибровочная кривая зависимости диаметра колец преципитации от концентрации иммуноглобулинов стандартной сыворотки

6. 1%-ный раствор натрия метриолата ( $C_6H_9HgO_2$ ) – 1 г мертиолата растворяют в 100 мл дистиллированной воды, хранят при  $4^{\circ}C$  в темной посуде;

7. окрашивающая жидкость – 0,1%-ный раствор амидо-черного 10В: 1 г краски растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты ( $CH_3COOH$ ), после чего объем раствора доводят дистиллированной водой до 1 л. Готовый раствор хранят при комнатной температуре в темной посуде;

8. раствор для промывания – 70 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 1 л дистиллированной водой.

*Материал для исследования.* Пробы сыворотки крови. Сыворотку можно хранить при  $-20^{\circ}C$  до 1 года. Пробы молока или молозива. Пробы после взятия выдерживают 16-20 ч при  $4^{\circ}C$  и центрифугируют в течение 1 ч при 6000 об/мин. Затем снимают верхний слой жира, отсасывают надосадочную жидкость, которую и используют для определения. Подготовленные таким образом пробы используют сразу или хранят для исследования при температуре  $-20^{\circ}C$ .

*Ход определения.*

1. Предварительно готовят пластинки из 3%-ного агара, смешанного с иммунной сывороткой. Для этого 360 мг агара помещают в пробирку вместимостью 40 мл, заливают 12 мл буфера и прибавляют 0,25 мл 1%-ного раствора мертиолата. Пробирку помещают на водяную баню с холодной водой, которую затем нагревают до кипения и выдерживают смесь до полного растворения агара. После расплавления гель охлаждают до  $56^{\circ}C$  и к нему приливают равный объем иммунной сыворотки в рабочем разведении и снова нагревают до температуры  $56^{\circ}C$ . Смесь тщательно перемешивают и выливают на стекло, помещенное на столике с уровнем в строго горизонтальном положении. После застывания геля в нем делают лунки диаметром 2 мм на расстоянии 15 мм друг от друга. Стекла с гелем можно сразу использовать или хранить в течение 7 дней в эксикаторе с налитой на дно водой при  $4^{\circ}C$ .

2. При определении содержания IgG пробы сыворотки крови разводят буфером (рН 8,0) в 20 и 30 раз, пробы молозива первого дня лактации – в 100, 50 и 20 раз, пробы молозива последующих дней лактации – в 50, 20 и 10 раз, пробы молока используют неразведенные и разведенные в 10 раз. При определении содержания IgM пробы сыворотки крови разводят в 10 и 5 раз, пробы молозива – в 10 и 5 раз, пробы молока используют неразведенные или разведенные в 5 раз. При определении содержания IgA пробы сыворотки крови используют неразведенные, пробы молозива и молока – неразведенные или разведенные в 5 и 2 раза. Пробы сыворотки крови от новорожденных телят до приема молозива во всех случаях используют неразведенные.

3. Подготовленные пробы испытываемого материала вносят в лунки геля с антисывороткой с помощью пастеровской пипетки с оттянутым

капилляром. При этом лунку заполняют полностью, не переливая пробы за ее пределы.

4. Параллельно с опытными пробами на каждом стекле ставят контроль – разливают в лунки стандартный препарат определенного иммуноглобулина. При этом его разводят буферным раствором с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора препарата содержалось 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мл белка. Таким образом, на каждом стекле получается шесть лунок с контрольной пробой препарата.

5. После заполнения лунок стекла помещают в эксикатор с водой и выдерживают при комнатной температуре при определении IgG и IgA в течение 24 ч, при определении IgM – 48 ч.

#### *Расчет результатов.*

- По окончании сроков инкубации стекла извлекают из эксикатора и измеряют диаметр кольца преципитата вокруг лунок с опытными и контрольными пробами с помощью измерительного циркуля. Однако измерение удобнее производить линейкой типа Беринг-Верке после окрашивания агаровых пластинок. С этой целью стекла с агаром погружают на 2 сут в буфер. В течение этого срока буфер трижды заменяют новой порцией. После отмывания от не участвующих в реакции веществ пластинки агара высушивают при комнатной температуре под фильтровальной бумагой. Удалив последнюю, пластинки помещают в раствор амидо-черного на 3 ч и после трехкратного отмывания раствором уксусной кислоты высушивают.

- Для расчета содержания иммуноглобулинов в испытываемых пробах строят калибровочную кривую на полулогарифмической бумаге: по оси ординат откладывают концентрацию белка в пробах стандарта, по оси абсцисс – диаметр кольца преципитата. Калибровочную кривую строят отдельно по каждому стандартному ряду (препарату иммуноглобулина определенного класса).

- Количество иммуноглобулина в испытываемой пробе определяют путем сравнения диаметра кольца преципитата вокруг ее лунки с калибровочной кривой. Например, диаметр кольца преципитата испытываемой пробы составляет 8 мм. По калибровочной кривой это соответствует 0,5 мг/мл IgG.

#### **7.4. Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге**

(Колб В.Г., Камышников В.С.

«Справочник по клинической химии», 1982)

Существует определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза в агаровом геле (Гордон, 1949; Грабар 1964), в крахмальном геле (Смитис, 1959; Тодоров, 1968; Ларский, 1971), в

полиакриламидном геле. С помощью последнего метода можно получить до 30 белковых фракций.

Метод электрофореза на бумаге был введен в 50-х годах ученым Даррум и с тех пор широко применяется в клиничко-диагностических лабораториях. Недостатком этого метода является не всегда четкое разделение белков из-за химической неоднородности бумаги, а также длительность процесса разделения, окрашивания, отмывания, элюции и др.

Электрофорез на ацетате целлюлозы в настоящее время представлен в модификации Хромова В.А.(1976), Пушкарева М.А. (1977).

*Принцип метода.* Под влиянием постоянного электрического поля белки сыворотки, обладающие электрическим зарядом, движутся по смоченной буферным раствором бумаге со скоростью, зависящей от величины заряда и молекулярного веса частиц. Вследствие этого белки сыворотки крови разделяют обычно на пять фракций: альбумины и  $\alpha_1$  -,  $\alpha_2$  -,  $\beta$ - и гамма-глобулины.

Существуют различные аппараты для проведения электрофореза на бумаге. Однако основные требования к приборам и процессу осуществления электрофореза – общие:

- постоянный ток силой 50-100мА при напряжении 180-400 В;
- камера с постоянной влажностью воздуха;
- буферный раствор в разных отделах камеры должен иметь одинаковый уровень, чтобы избежать его перелива через ленту в результате сифонного действия;
- концы бумажных полос нельзя погружать в буферный раствор, где находятся электроды;
- электрическая связь между лентами и электродами устанавливают посредством фитильков из ваты, марли или бумажных полосок, смоченных буферным раствором;
- полоса бумаги может быть расположена горизонтально (горизонтальный электрофорез) или под углом (вертикальный). В первом случае - лучшие результаты;
- фильтровальная бумага должна быть плотной и однородной (хроматографическая).

Бумага имеет гладкую лицевую и рубчатую обратную стороны. Бумажные полоски, применяемые для электрофореза, размером 3,5x40 мм нарезают таким образом, чтобы волокна целлюлозы шли вдоль полосок. На одном из концов каждой полоски отмечают номер анализа и дату забора крови для исследования.

Перед электрофорезом камеру устанавливают строго горизонтально. Пластинки с электродами от камеры отсоединяют. Кюветы прибора заполняют буферным раствором таким образом, чтобы уровень жидкости в них был одинаков, и оба отделения каждой кюветы соединяют друг с другом полоской фильтровальной бумаги. Укрепляют пластинки с электродами. На мостик, связывающий обе кюветы, помещают полоски

хроматографической бумаги. Концы полос находятся в буферном растворе. Затем прибор закрывают крышкой и дают бумажным полосам пропитаться буферным раствором, после этого крышку снимают, на заранее отмеченные у катода участки бумаги наносят сыворотку.

На узкий край шлифовального стекла наносят из 0,1 мл микропипетки 0,01 мл свежеполученной (негемолизированной) сыворотки. Бумагу подставляют, чтобы впитала сыворотку.

Наносить сыворотку на бумагу можно непосредственно из пипетки таким образом, чтобы след сыворотки составил поперечную полоску. Допустимо окрашивание сыворотки перед ее нанесением на полосу хроматографической бумаги. Для этого к 0,5 мл сыворотки добавляют несколько крупинок порошка бромфенолового синего. *По перемещению пятен красителя, связывающегося, прежде всего с альбуминами, можно визуально следить за миграцией пятен.*

Затем крышку камеры плотно закрывают, включают прибор и через бумажные полосы начинают пропускать постоянный электрический ток.

Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови осуществляют при комнатной температуре и градиенте потенциала от 3 до 8 В на 1 м длины бумажной полоски. Оптимальное время электрофореза 7-12-16-20 часов. Для биологических исследований (около 15 образцов) время составляет 1,5-2 часа. После окончания электрофореза бумажные полоски развешивают на стеклянные палочки, затем помещают в горячий сушильный шкаф +95-105 °С в течение 10-15 минут.

Для окраски электрофореграмм после фиксации сухие ленты кладут в развернутом виде на дно плоских эмалированных кювет. Окраску белковых фракций раствором бромфенолового производят, погружая бумажные полоски на определенное время в кювету с красящим раствором.

Вероналовый (веронал-мединаловый буфер) с рН 8,6. Для приготовления буфера 10,32 г мединала (натриевая соль веронала) растворяют в химическом стакане емкостью 500 мл в 300 мл дистиллированной воды потом добавляют 1,84 г веронала и, помешивая, нагревают смесь на водяной бане до его растворения. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл. Для этого химический стакан несколько раз обмывают дистиллированной водой, сливая раствор в мерную колбу. Остывший раствор доводят до метки и определяют рН.

*Окрашивающие реагенты. Красящий раствор с бромфеноловым синим и сернокислым цинком:*

а) бромфеноловый синий (индикатор) 0,1 г, кристаллический сернокислый цинк – 50 г, уксусная кислота (ледяная) – 50 мл, дистиллированная вода – 100 мл. Сухие ленты выдерживают в этом красителе 30 минут.

Затем фореграммы обрабатывают в нескольких (обычно в 3-5) сменах отмывающего раствора (20 мл ледяной уксусной кислоты и 980 мл

воды) для удаления не связавшейся с белком краски. Пока фон лент не делается белым, а промывная жидкость не перестанет окрашиваться в желтый цвет. Отмытые ленты высушивают на воздухе при комнатной температуре в затемненном месте. Для получения более интенсивной окраски фракций высушенные ленты проводят над открытой бутылкой с концентрированным раствором аммиака. Пары аммиака нейтрализуют остатки уксусной кислоты. При этом светло-зеленые пятна белковых фракций превращаются в ярко-синие. Сухие, окрашенные электрофореграммы, хранят в темноте.

Дальнейшая количественная обработка электрофореграмм состоит в извлечении краски из бумаги (элюция) с последующим измерением оптической плотности окрашенного раствора на фотоэлектрокалориметре (ФЭКе), либо учете с помощью денситометра. При элюировании определяют величину экстинкции каждой фракции и общую сумму экстинкции, которую принимают за 100% (выражая результаты в процентах) или же за величину содержания отдельных белковых фракций выражают в абсолютных единицах.

Сухие электрофореграммы разрезают по числу фракций, ориентируясь на самый светлый участок между ними. Каждую фракцию помещают в отдельную пробирку и заливают 3 мл элюирующего раствора. К альбуминовой фракции добавляют 9 мл раствора. На основании этого величину оптической плотности первой пробирки умножают на 3. Можно в каждую пробирку вносить по 5 мл элюирующего раствора. Контролем служит участок фореграммы, не содержащий белка. Пробирки осторожно встряхивают и оставляют в затемненном месте на 30 минут (или до 60 минут).

В контрольные кюветы наливают элюирующий раствор, по которому устанавливают нулевое положение гальванометра. Растворы для элюции краски из окрашенных электрофореграмм – 0,1 н раствор едкого натра (0,4 г NaOH в 1000 мл дистиллированной воды).

Определение процентного соотношения белковых фракций методом иллюирования с последующим фотометрированием считается более точным, чем проведение его в помощью денситометра.

Расчет производят следующим образом. Сумму цифр оптических плотностей принимают за 100%, тогда каждая фракция составляет X от 100.

Пример: Оптическая плотность (E) фракция альбуминов – 0,52;  $\alpha_1$ -глобулинов - 0,02;  $\alpha_2$ -глобулинов – 0,05; бета-глобулинов – 0,1; гамма-глобулинов – 0,15. В сумме E=0,84 (100%), тогда альбумины 0,52=61,9% соответственно.

Чтобы выразить белковые фракции в г/л следует определить общий белок сыворотки крови. Пусть общий белок равен 82 г/л, сумма экстинкции фракций – 0,84, тогда альбумины (при E=0,52) принимаем за X.

$$X=(82 \times 0,52)/0,84=50,7 \text{ г/л}$$

## 7.5. Определение общего белка сыворотки крови рефрактометрическим методом (Еременко В.И., 2001)

Белки являются структурными элементами клеток ферментов, белковых гормонов. Все белки являются специфическими в зависимости от выполняемой функции. В крови циркулирует большое количество разных белков. По уровню белка в крови судят о белоксинтезирующей функции организма. Концентрация белка в крови подвержена значительным колебаниям и зависит от возраста животных, сезона года, уровня кормления и продуктивности животных.

В основу рефрактометрического метода входит определение показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества. В сыворотке крови величина рефракции в первую очередь зависит от количества белка.

*Реактивы:* смесь этилового спирта с эфиром 1:1. Из оборудования используют рефрактометр любого типа.

*Ход определения.* Устанавливают прибор на ноль по дистиллированной воде при температуре 20°C. Заблаговременно верхнюю и нижнюю камеры протирают марлевой салфеткой, смоченной в смеси спирта с эфиром, и насухо ватным тампоном. Поверхность призм при установке прибора на ноль и исследовании образца сыворотки крови должна быть чистой и сухой (от этого зависит результат анализа).

Окуляр шкалы коэффициентов преломления ставят в крайнее положение «на себя». Опускают нижнюю половину камеры, на призму наносят 1-2 капли дистиллированной воды. Камеру закрывают, окуляр шкалы и окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость. Дисперсию в окуляре зрительной трубы убирают вращением винта лимбы дисперсии.

Линию окуляра шкалы устанавливают на цифру 1,3330 (показатель преломления воды) и в зрительной трубе наблюдают границу светотени по отношению к точке пересечения двух перпендикулярных линий. Если граница светотени проходит через точку пересечения линий, то прибор установлено на ноль. Если этого нет, то с помощью ключа и маленького винта на корпусе зрительной трубы устанавливают границу светотени на точку пересечения линий. Поверхность призм вытирают мягкой марлевой салфеткой и ватным тампоном.

После этого приступают к исследованию образцов крови. Стеклопалочкой наносят на нижнюю призму 1-2 капли сыворотки крови и плотно закрывают камеру. Зеркалом направляют свет в окно камеры и поворачивают до тех пор, пока граница светотени не достигнет пересечения двух линий.

Через окуляр по шкале отсчета показателя преломления дважды делают его отсчет. Рассчитывают средний показатель. Марлевой салфеткой убирают с поверхности призм сыворотку, протирают каждую призму смоченным спиртово-эфирной смесью ватным тампоном и сухим

тампоном. Стекланную палочку промывают в дистиллированной воде и высушивают марлей или ватой. После этого исследуют следующую пробу.

Содержание белка (%) определяют по таблице с учетом величины показателя преломления рефрактометра. Если температура в камере во время исследования не отвечает 20°C, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус; при низкой температуре поправку отнимают, при более высокой - прибавляют.

Таблица 22

Содержание белка сыворотки крови по показателю преломления рефрактометра

Пок. прел.	Бе лок, %								
1,3431	4,16	1,3477	6,82	1,3502	8,26	1,3527	9,73	1,3552	11,09
1,3435	4,38	1,3478	6,88	1,3503	8,33	1,3528	9,78	1,3553	11,15
1,3439	4,60	1,3479	6,93	1,3504	8,38	1,3529	9,84	1,3554	11,21
1,3443	4,81	1,3480	7,04	1,3505	5,44	1,3530	9,89	1,3555	11,26
1,3446	5,03	1,3481	7,10	1,3506	8,49	1,3531	9,94	1,3556	11,32
1,3450	5,25	1,3482	7,15	1,3507	8,55	1,3532	9,99	1,3557	11,37
1,3454	5,47	1,3483	7,20	1,3508	8,61	1,3533	10,05	1,3558	11,42
1,3458	5,68	1,3484	7,25	1,3509	8,67	1,3534	10,1	1,3559	11,47
1,3460	5,92	1,3485	7,31	1,3510	8,73	1,3535	10,17	1,3560	11,52
1,3461	5,97	1,3486	7,36	1,3511	8,80	1,3536	10,23	1,3561	11,57
1,3462	6,02	1,3487	7,42	1,3512	8,86	1,3537	10,28	1,3562	11,62
1,3463	6,07	1,3488	7,48	1,3513	8,92	1,3538	10,33	1,3563	11,67
1,3464	6,12	1,3489	7,54	1,3514	8,97	1,0539	10,39	1,3564	11,71
1,3465	6,18	1,3490	7,59	1,3515	9,03	1,3540	10,44	1,3565	11,77
1,3466	6,23	1,3491	7,63	1,3516	9,08	1,3541	10,49	1,3566	11,82
1,3467	6,29	1,3492	7,68	1,3517	9,14	1,3542	10,54	1,3567	11,87
1,3468	6,34	1,3493	7,73	1,3518	9,2	1,3543	10,6	1,3568	11,93
1,3469	6,40	1,3494	7,79	1,3519	9,26	1,3544	10,64	1,3569	11,98
1,3470	6,45	1,3495	7,83	1,3520	9,32	1,3545	10,70	1,3570	12,04
1,3471	6,50	1,3496	7,91	1,3521	9,40	1,3546	10,75	1,3571	12,10
1,3472	6,55	1,3497	7,96	1,3522	9,46	1,3547	10,80		
1,3473	6,60	1,3498	8,02	1,3523	9,51	1,3548	10,86		
1,3474	6,65	1,3499	8,08	1,3524	9,57	1,3549	10,92		
1,3475	6,71	1,3500	8,14	1,3525	9,63	1,3550	10,98		
1,3476	6,77	1,3501	8,20	1,3526	9,68	1,3551	11,04		

**8.6. Разделение липидов сыворотки крови методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufor (Кучеренко Н.Е. и др., 1988)**

Принцип метода: метод основан на способности жидкой фазы продвигающейся по слою адсорбента за счет капиллярных сил,

перемещать с различными скоростями компоненты разделяющей смеси. Положение пятен разделяемых веществ на хроматограмме характеризуется значением  $R_f$ , которое представляет собой соотношение расстояний, пройденных веществом и подвижной фазой от точки старта.

Материалы и реактивы: сыворотка крови, смесь хлороформа и метанола (1:1), растворитель - смесь н-гексана, эфира и уксусной кислоты (80:20:1), кристаллический йод, пластинки Silufor, бумажные фильтры.

Оборудование: пипетки, микропипетки, пробирки, воронки, стакан, водяная баня, газовая горелка, термостаты с заданной температурой 50 и 100 °С.

Ход работы: к 1 мл сыворотки крови добавляют 10 мл смеси хлороформа и метанола, инкубируют в течение 5 мин при  $t$  50 °С. Смесь, после инкубации фильтруют, а затем выпаривают. Сухой остаток растворяют в 1 мл смеси хлороформа и метанола. Пластинку Silufor (15x15) промывают растворителями (н-гексан, эфир, уксусная кислота) и высушивают в термостате в течение 30 мин, при  $t$  100 °С. На пластинку в 2 см от нижнего края наносят раствор липидов в количестве 10-20 мкг и проводят разделение восходящим способом в растворителе на расстоянии 10 см.

После высушивания пластин под тягой результаты разделения выявляют в парах йода. Для этого в стеклянный стакан кладут несколько кристаллов йода, накрывают его стеклом и ставят на водяную баню ( $t$  60 °С). Через несколько минут в стакан при комнатной температуре вносят пластинку, выдерживая ее 3-5 мин. Липиды проявляются в виде желтых или желто-коричневых пятен на белом или слабо-желтом фоне пластинки.

Липиды сыворотки крови на хроматограмме располагаются в порядке убывания величины  $R_f$ : эфиры холестерина, триацилглицерола, жирные кислоты, холестерин, фосфолипиды.

## **8.Классификация белков кормов по принципу их растворимости.**

### **Методы определения фракций белков.**

**(Винниченко А.Н., Дворецкий А.И., 1989)**

Наиболее широкое распространение получила классификация белков по принципу их растворимости, разработанная Т.Б.Осборном в 1907 г. При последовательной обработке биообразцов водой, 5-10%-ным раствором хлористого натрия, 70%-ным этаном и 0,1-0,2%-ным раствором едкого натра получены белковые экстракты, названные альбуминами, глобулинами, проламинами, глютелинами. Данный метод фракционирования белков стал классическим и не утратил своей актуальности и в настоящее время.

Альбумины и глобулины представлены в основном функционально активными белками - ферментами и ингибиторами.

Основным местом их локализации являются зародыш и алейроновый слой зерна; они выполняют также структурные функции.

Белковые фракции неидентичны по аминокислотному составу.

Для альбуминов (водорастворимой фракции) характерно высокое содержание важнейших незаменимых аминокислот: лизина (6,7%), аргинина (7,5%), треонина (5,4%), валина (7%), составляющих в сумме 48,5% от общего белка. Из заменимых аминокислот наибольшим количеством представлены глутаминовая (19,82%) и аспарагиновая (9%).

Глобулины зерна кукурузы (солерастворимая фракция), как и альбумины, характеризуются высокой питательной ценностью; сумма незаменимых аминокислот составляет 42,78%, а из заменимых наиболее высокое содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот, глицина, аланина. Альбумины и глобулины представляют собой гетерогенные комплексы белков, компоненты которых отличаются по физическим и химическим свойствам.

Для всех злаковых культур характерно высокое (до 80%) содержание запасных белков - проламинов и глютелинов, местом локализации которых является эндосперм.

Проламины злаков - зеин кукурузы, глиадин пшеницы, гордеин ячменя, секалин ржи - содержат крайне низкое количество (около 1%) лизина и триптофана. Это основная причина несбалансированности зерновых культур по аминокислотному составу. Проламины кукурузы бедны гистидином, аргинином, треонином, метионином, богаты глутаминовой кислотой и пролином (около третьей части от суммы всех аминокислот), в зеинах 18% лейцина. В связи с высоким содержанием пролина спирторастворимая фракция получила название проламинов. Аминокислотный состав мало подвержен изменениям в зависимости от условий окружающей среды и генетических факторов. Спирторастворимые белки, как и другие фракции, представляют собой сложную смесь компонентов. Локализация проламинов в эндосперме, несбалансированность по аминокислотному составу, стабильность к действию физических факторов, отсутствие энзиматической активности позволяют рассматривать их как специализированные белки, выполняющие запасные функции в семени и представляющие источник легко мобилизуемого запаса глутаминовой кислоты и пролина. Проламины наиболее биоэнергетически выгодные белки, так как на их единицу при синтезе идет меньше энергетических затрат, чем на биосинтез других фракций.

Глютелины представлены значительным количеством в суммарном белке злаков и по аминокислотному составу занимают промежуточное положение между глобулинами и проламинами. Так, содержание лизина у них составляет 2,71%. В глютелинах содержится более высокое, чем в проламинах, количество аргинина, гистидина, глицина, однако по питательной ценности суммарные глютелины уступают альбуминам и глобулинам. Глютелиновую фракцию белков

зерновых культур разделяют на три подфракции: проламино- (для кукурузы), глютелиноподобные белки и истинные глютелины.

Фракцию проламиноподобных белков извлекают после удаления глобулинов и проламинов путем добавления к спирту восстановителей типа 2-меркаптоэтанола, затем боратным буфером pH 10 с меркаптоэтанолом экстрагируют глютелиноподобны белки (таблица 23).

Таблица 23

Экстракция белковых фракций

Растворитель	Время экстракции, мин	t, °C	Белковая фракция
0,5 М NaCl	60 30 30	4	Альбумино-глобулиновая
Этиловый спирт 70%-ный	30 30 30	20	Зеины, или зеин-1
Этиловый спирт 70%-ный +2меркаптоэтанола (2МЕ) 0,6%-ного (V/V)	30 30	20	Зеиноподобные белки, или зеин-2
Боратный буфер pH 10+2-МЕ 0,6%-ного (V/V)	60 30	20	Глютелиноподобный белок
Боратный буфер pH 10 +2-МЕ 0,6%-ного (V/V) + SDS 0,5%- ного (W/V)	60 30 15	-	Глютелины

Фракции глютелиноподобных белков и истинных глютелинов по растворимости в воде при диализе распределяются на растворимые и нерастворимые белки.

Истинные глютелины характеризуются высокой питательной ценностью и по содержанию важнейших незаменимых аминокислот не уступают альбуминам. Они содержат лизина 6,31%, аргинина - 5,31%, треонина - 4,6%, валина 7,81%, метионина - 2,54%; сумма незаменимых аминокислот - 49,8%.

Соотношение белковых фракций в кормах во многом определяет их питательную ценность. Белки кормовых продуктов под действием протеолитических ферментов в желудочно-кишечном тракте животных расщепляются до аминокислот и, поступая в кровь через кишечную стенку, вовлекаются в обменные процессы. Следовательно, организм нуждается не в самом белке, а в продуктах его расщепления - аминокислотах. На получение 1 кг животного белка необходимо израсходовать 5-6 кг растительного белка. Коэффициенты трансформации

при этом зависят от полноценности корма и при неудовлетворительном по белку кормлении резко понижаются.

Главным источником белка для сельскохозяйственных животных являются в первую очередь корма зерновых культур.

*Подготовка образца для анализа.* Зерно тщательно очищают от колосовых чешуй и пленок, взвешивают, размалывают на электрической мельнице и просеивают через сито. Для анализа желательно использовать свежеприготовленную муку. При экстракции белков из зерна кукурузы предварительно необходимо обезжирить пробы с соблюдением указанных мер предосторожности - четыре раза с экспозицией в 1 ч. Для исключения потерь наиболее легких частиц муки обезжиривание лучше проводить в пакетах из фильтровальной бумаги. Эфир удаляют высушиванием при комнатной температуре до исчезновения запаха. Затем приступают к экстракции белков (таблица 24).

Таблица 24

Схема экстракции белков кукурузы

Фракция	Растворитель	Условия экстракции					
		I		II		III	
		мин	t°C	мин	t°C	мин	t°C
Альбумины	Дистиллированная вода	60	4	60	4	60	4
Глобулины	0,5М NaCl или 0,1М NaCl на фосфатном буфере рН 7-7,4	60	4	60	4	60	4
Промывание от солей	Дистиллированная вода	15	4	15	4	-	-
Зеины	70%-ный этанол	60	20	60	20	120	40
Глютелины	Боратный буфер + 0,5%-ный додецилсульфат (W/V)	60	20	60	20	120	20
Белки Зеиноподобные	70%-ный этанол + 0,6%-ный 2-меркаптоэтанол (2-ME) (V/V)	60	20	60	20	60	20
Глютелино подобные	Боратный буфер рН 10 + 0,6%-ный 2-ME (V/V)	60	20	60	20	60	20
Остаточные	Тритон X-100	60	20	60	20	-	-

Альбумины и глобулины экстрагируют из обезжиренной муки пятикратным объемом 1 М NaCl, забуференного фосфатами (0,2М

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $0,2 \text{ M Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) до pH 7-7,4. Экстракцию ведут в течение 1 ч при температуре  $4^\circ\text{C}$ . Надосадочную жидкость отделяют центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин на холоде. Экстрагирование и центрифугирование водо-, солерастворимых белков повторяют трижды. Супернатант после каждого центрифугирования объединяют.

Концентрирование и очистку белков от небелковых примесей осуществляют осаждением их из экстракта путем добавления сернокислого аммония до 70% насыщения. Для этого к экстракту добавляют по каплям насыщенный раствор сульфата аммония при постоянном перемешивании из расчета семь частей насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  на одну часть экстракта. Осадок формируется на 2-3 ч, затем его отделяют центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин, растворяют в минимальном объеме  $0,2 \text{ M NaCl}$  на фосфатном буфере pH 7-7,4. Он должен образовать прозрачный раствор, так как плохое растворение может быть результатом денатурации белка при быстром добавлении сернокислого аммония к экстракту. Такие растворы для дальнейшей работы непригодны.

Альбумины отделяют от глобулинов диализом против дистиллированной воды в течение 48 ч на холоде. Глобулины выпадают в осадок, а альбумины остаются в надосадочной жидкости. Глобулины не растворимы в воде, но для полного осаждения их надосадочную жидкость после диализа подкисляют  $0,036 \text{ M}$  уксусной кислотой до pH 5.

Зеины извлекают из центрифугата после экстракции водо-, солерастворимых белков. Для этого к осадку приливают пятикратный по отношению к исходной навеске объем этилового спирта, конечная концентрация которого должна быть не ниже 55%. Первую и вторую экстракции проводят при  $20^\circ\text{C}$ , третью – при  $60^\circ\text{C}$  в течение 1 ч тремя объемами спирта. В каждом случае экстракт отделяют центрифугированием при 3000 об/мин за 30 мин. При наличии значительного количества пигментов супернатант пропускают через активированный уголь, как указано выше. Объединенный центрифугат охлаждают до  $4^\circ\text{C}$  и все дальнейшие операции производят на холоде. Из центрифугата зеин осаждают диализом против дистиллированной воды или добавлением к раствору трех объемов  $0,1 \text{ M}$  хлористого натрия. Осадок формируется в течение часа, после чего его отделяют центрифугированием при 3000 об/мин. Образец диализуют в течение двух-трех суток. Осадок просушивают до исчезновения запаха спирта.

Глютелины извлекают из остатка пятикратным объемом  $0,05 \text{ N NaOH}$  в течение 3 ч на холоде. Экстракт отделяют центрифугированием при 6000 об/мин. Раствор щелочи в отличие от кислоты позволяет извлечь практически весь глютелин. Экстракцию проводят трижды. В каждом случае экстракт отделяют центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20-30 мин.

Остаточные белки извлекают из остатка навески после полного удаления водо-, соле-, спирто- и щелочерастворимых белков, обработкой тритоном. Экстракция проводится два раза пятикратным объемом 0,2% тритона X-100 в течение 4 ч при периодическом помешивании. Центрифугируют при 6000 об/мин 20 мин.

Для приготовления 1 М NaCl на 0,1М фосфатном буфере pH 7 58,5 г NaCl растворяют в 1 л 0,1 М фосфатного буфера, составленного из маточных растворов: А – 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  содержит 28,392 г безводного  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  или 35,598 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  или 71,629 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  в 1 л дистиллированной воды; В – 0,2 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  содержит 27,598 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  или 31,202 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  в 1 л дистиллированной воды.

Для получения 0,1М буфера pH 7 берут 305 мл раствора А и доводят дистиллированной водой до 1 л.

Чтобы извлечь восстановленные белки, экстрагируют сумму водо-, солерастворимых белков 0,5 М NaCl на дистиллированной воде в соотношении навеска: растворитель 1:10. Время первой экстракции 60 мин, двух последующих – 30. Затем осадок дважды заливают дистиллированной водой по 15 мин и при наличии в супернатанте реакции на белок водную вытяжку объединяют с солевой. Зеин экстрагируют 70%-ным изопропиловым или этиловым спиртом. Операцию проводят с экспозицией в 30 мин при комнатной температуре. После каждой экстракции смесь центрифугируют, супернатанты объединяют. Получают фракцию зеин – 1. Далее приступают к экстракции зеиноподобных белков, характеризуемых как зеин-II. В качестве растворителя используют 70%-ный раствор этилового или изопропилового спирта с 0,6%-ным 2-меркаптоэтанолом (объем к объему). Экстракцию проводят трижды. Врем экспозиции – 30 мин при комнатной температуре.

Глютелиноподобный белок извлекают аналогичным образом, используя в качестве растворителя боратный буфер (pH 10) с 0,6%-ным меркаптоэтанолом (по объему). Истинные глютелины экстрагируют вышеуказанным раствором с добавлением 0,5% додецилсульфата натрия (масса к объему). Время первых экстракций глютелиноподобных белков и глютелинов – 60 мин, вторых – 30 и третьих – 15 мин. Таким образом, данный метод позволяет выделить зеино- и глютелиноподобные белки, которые без восстановителей обычно попадают в глютелиновую фракцию.

Недостаток данного метода в том, что экстрагируемые белки получаются сильно разбавленными. С этой целью все применяемые растворители можно вводить в соотношении 1:5 и увеличить время экстракций.

Часто при экстракции альбуминов в качестве растворителя используют дистиллированную воду. При этом навеску растительного материала заливают пяти-шестикратным объемом бидистиллированной воды и оставляют на 1-2 ч в холодильнике, постоянно перемешивая. Экстракцию проводят трижды. Супернатант отделяют центрифугированием при 4 °С. Во время обработки тканей растений

водой в раствор наряду с белками переходят сахара, минеральные соли, свободные аминокислоты. В связи с этим полученный экстракт следует рассматривать как слабосолевой раствор, в который могут переходить не только альбумины, но и часть глобулинов. Последние, называют легкорастворимыми глобулинами, так как они выходят в раствор при очень низких концентрациях солей, содержащихся в экстракте. Разделение альбуминов и легкорастворимых глобулинов проводят диализом против дистиллированной воды. Для этого используют полупроницаемые материалы (мембраны), чаще всего целлофан. Диализ проводят 12-24 ч. В процессе диализа низкомолекулярные вещества (минеральные соли, свободные аминокислоты и др.) выходят из целлофанового мешочка и вымываются водой. Белки как высокомолекулярные соединения не проходят через полупроницаемые мембраны. К концу диализа раствор в мешочке не содержит солей, солерастворимые белки выпадают в осадок, а в растворе остаются только альбумины. Водо- и солерастворимые белки отделяют центрифугированием. Осадок легкорастворимых глобулинов смывают раствором.

Все фракции, выделенные описанными выше методами, в дальнейшем должны получить количественную оценку.

При **диск-электрофорезе** смесь белков кормов подвергается одновременному воздействию электрического поля и градиента рН в полиакриламидных гелях (ПААГ), обладающих рядом свойств, благодаря которым они особенно успешно применяются для разделения макромолекул:

- Размер пор у них может варьировать в широких пределах;
- Их можно применять с самыми разными буферами;
- Разделение происходит очень быстро;
- Адсорбция и электроосмос низки;
- Они не поглощают ультрафиолетовый свет при 270 нм, и, следовательно, местоположение белков после разделения можно определить по поглощению при этой длине волны;

После разделения макромолекулы можно окрашивать и определять количество вещества с помощью денситометра.

ПААГ получают при сополимеризации акриламида и метиленбисакриламида в присутствии соответствующего катализатора: рибофлавина, персульфата аммония (ПРСА), тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД). Пористость геля определяется соотношением между акриламидом и метиленбисакриламидом (МБА).

Высокая разрешающая способность диск-электрофореза базируется на двух физических явлениях:

- Эффект концентрирования состоит в том, что смеси перед их разделением на компоненты концентрируются в четко ограниченной зоне;
- При эффекте молекулярного сита отдельные молекулы разделяются при электрофорезе не только по их общему электрическому

заряду, но и по величине (молекулярный вес), форме (третичная структура).

При разделении растворимых компонентов эта смесь сначала концентрируется в узкой полосе крупнопористого геля, а затем в мелкопористом распределяется по величине, форме и заряду молекул.

При разделении водо- и солерастворимых белков эндосперма кукурузы методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле используют реактивы: акриламид, метиленбисакриламид (МБА), трис, ТЕМЕД, рибофлавин, 1 N HCl, деминерализованная вода (ДМ-вода), краситель амидочерный 10В, уксусная кислота, глицин, бромфеноловый синий, аммоний надсерноокислый, трихлоруксусная кислота. Необходимо также оборудование: прибор для диск-электрофореза фирмы «Реанал» (Венгрия), блок питания и холодильный бокс фирмы ЛКБ (Швеция), рН-метр 340, шприц на 10-20 мл с длинной иглой.

Готовят рабочие растворы мелкопористого, крупнопористого геля и электродного буфера (рН 8,3).

Для полимеризации геля и последующего электрофореза используют стеклянные трубочки с отшлифованными краями с внутренним диаметром 6 мм и длиной 100 мм. На дно трубочек надевают резиновое кольцо-прокладку, затем с противоположного конца надевают конусное кольцо и, наконец, резьбовое зажимное кольцо. Подобным образом собранные колонки укрепляют в углублениях подставки и конусного кольца, исключая, при этом утечку раствора, не вступившего в полимеризацию.

В стеклянные трубочки вносят пипеткой по 2 мл раствора мелкопористого геля, затем сверху наслаивают 0,1 мл воды до образования ровной поверхности геля. По истечении 30-40 мин конец полимеризации можно заметить по слабому нагреванию стеклянных трубочек, а также по образованию хорошо видимой границы раздела между гелем и наслоенной водой. Стряхивают наслоенную жидкость.

В каждую колонку пипеткой вносят 0,2 мл раствора крупнопористого геля, затем наслаивают 0,1 мл воды и помещают около ультрафиолетовой лампы мощностью 250-500 Вт (фотополимеризация произойдет и при обычном свете, только за более длительный период времени). Начало образования геля замечают по переходу флюоресцирующего желто-зеленого цвета в опаловый, а конец – по резкому отделению геля от наслоенной жидкости; по окончании полимеризации ее сливают с геля, остатки собирают кусочком фильтровальной бумаги.

Стеклянные трубочки с гелем ввинчивают в концентрически расположенные отверстия, просверленные в дне верхнего буферного резервуара. После закрепления в трубочки вносят исследуемый раствор белка объемом 0,1-0,2 мл (при концентрации белка 6 мг/мл буферного раствора) и устанавливают электрод верхнего буферного резервуара.

Сверху исследуемый раствор посыпают сефадексом, несколько минут выдерживают и заливают пипеткой электродный буфер до конца трубочки.

Собранную верхнюю часть прибора присоединяют к нижнему буферному резервуару, предварительно заполненному буферным раствором, разбавленным в 10 раз. Взяв верхний буферный резервуар за стойки, укрепляют его на нижнем резервуаре винтами. Осторожно заполняют и верхний резервуар десятикратно разбавленным электродным буферным раствором, к которому предварительно подмешивают 4 мл бромфенолового синего красителя.

Прибор помещают в холодильник. Электроды присоединяют к соответствующим полюсам блока питания. При применяемой буферной системе электрофореза белки с более низкой изоэлектрической точкой, чем рН буферного раствора, будут продвигаться от катода к аноду, а при более высокой – от анода к катоду. В первые 15 мин электрофореза сила тока не должна превышать 1 мА на трубку. Затем силу тока можно увеличить до 5 мА на каждую.

После проведения электрофореза гелевые трубочки вынимают из верхнего буферного резервуара. Гель удаляют введением шприцем воды между поверхностью геля и стеклянной трубочки, помещают на 30 мин в 7%-ный раствор трихлоруксусной кислоты для фиксации белков при непрерывном встряхивании, затем окрашивают амидочерным в течение 20-25 мин, после этого промывают 7%-ным раствором уксусной кислоты (Нас). Многократной сменой раствора вымывают краситель, не связанный с белками, и часть геля, не содержащая белков, становится абсолютно прозрачной – электрофореграммы можно оценивать. Их хранят в течение 1-2 мес. В пробирках, наполненных 7%-ной Нас.

*Идентификация белков на электрофореграммах.* Белковые компоненты и зоны с ферментативной активностью сравнивают и характеризуют на основании их относительной электрофоретической подвижности ( $R_f$ ), при этом положение каждой зоны сравнивается с положением зоны краски-индикатора. Отсчет производят при помощи прозрачной линейки с точностью до 0,5 мм, начиная от старта (верхнего края мелкопористого геля) и до середины соответствующей зоны. Относительную электрофоретическую подвижность рассчитывают по формуле:

---

Расстояние от старта до середины зоны белка

---

Расстояние от старта до середины зоны краски-индикатора

Расстояние от старта до середины зоны краски-индикатора и выражают десятичной дробью. Идентичными могут быть признаны зоны,  $R_f$  которых отличается меньше на 2%. Пробег краски-индикатора на сравниваемых электрофореграммах должен быть одинаковым, отличаясь не более чем на 2 мм.

На основании направления их движения при определенном значении рН (к аноду или катоду) белки могут быть охарактеризованы как кислые или щелочные, особенно при разделении в нейтральном геле.

## **9. Ферментные препараты. Активность ферментов.**

(Ездаков Н.В., 1976)

Многие питательные вещества в кормах находятся в трудно доступной форме. Молодняк животных рождается с недоразвитой ферментной системой пищеварения. Да и взрослые животные переваривают в лучшем случае 60-70 % питательных веществ корма. Повышение переваримости питательных веществ, хотя бы на несколько процентов, позволило бы получить значительное количество дополнительной продукции. Разрешены к применению в животноводстве целый ряд ферментных препаратов, содержащих амилалитические, протеолитические, пектинолитические, цитолитические и целлюлозолитические ферменты. Одним из путей решения этой важной задачи является введение в рацион животных ферментных препаратов микробного происхождения.

*Ферменты* (энзимы) — это специфические белки, выполняющие в живом организме роль биологических катализаторов. Ферменты в отличие от гормонов и биостимуляторов действуют не на организм животных, а на компоненты корма в желудочно-кишечном тракте, они не накапливаются в организме и продуктах птицеводства и животноводства. Расщепляя или синтезируя вещества, сами ферменты могут не изменяться. Они не входят в состав конечных продуктов реакции и после окончания пищеварения остаются в прежнем количестве.

Для нужд сельского хозяйства промышленность выпускает ферментные препараты грибного и бактериального происхождения. Первые получают поверхностным методом выращивания и их обозначают буквой П, вторые — глубинным и обозначают буквой Г. Название ферментного препарата складывается из основного фермента и видового названия микроорганизма — продуцента.

За *единицу активности* любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин).

### **9.1. Методы получения ферментных препаратов (поверхностный и глубинный). Характеристика ферментных препаратов.**

*Краткая технология производства и характеристика нативных культур при поверхностном способе культивирования продуцента.* Поверхностный метод основан на выращивании грибной культуры на поверхности тонкого слоя пористой, хорошо аэрируемой питательной среды. Средой служат пшеничные отруби крупного помола с небольшим содержанием мучки, свекловичного жома и других непищевых отходов.

Отруби засыпают в стерилизатор со шнековой мешалкой, увлажняют до 35-38%, прогревают и стерилизуют паром при давлении 0,7 атм, в течение часа периодически перемешивая. Затем среду охлаждают до 40-42 °С и засевают суспензией спор чистой культуры (0,5-0,6% от веса отрубей в стерилизаторе). После этого отруби из стерилизатора раскладывают в кюветы из оцинкованного железа с сетчатым дном (размер 50-70 см).

Кюветы помещают в растительные камеры. Влажность отрубей должна быть 56-60%, температура 30-32 °С. Спустя 30-36 часов содержимое кювет дробят, высушивают до влажности 10-12% и расфасовывают в мешки или направляют в диффузную батарею для вымывания ферментов с последующей доочисткой и осаждением их спиртом.

По описанной технологии с некоторыми изменениями, связанными со специфичностью продуцентов, получают ферментные препараты: амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх и др.

Амилоризин Пх. Данный препарат представляет собой высушенную культуру плесневого гриба *Asp. oryzae* (влажность не более 13%). Препарат содержит  $\alpha$ -амилазу, декстриназу, мальтазу, глюкоамилазу и протеазу. Основным ферментом, по которому стандартизируют препарат, является  $\alpha$ -амилаза (150 ед. АС на 1 г препарата). Оптимальный рН для  $\alpha$ -амилазы – 5,6, поэтому она более продолжительно действует в верхних зонах желудка, чем слюнная с рН 6,8-7,0.

Глюкаваморин Пх – это высушенная культура плесневого гриба *Asp. awamori* 22 (с влажностью не более 13 %). Содержит  $\alpha$ -амилазу, декстриназу, мальтазу, глюкоамилазу, кислую протеазу и гемицеллюлазу. Основным ферментом, по которому стандартизуется препарат – глюкоамилаза (50 ед/г препарата). Указанный комплекс ферментов активен в более кислой среде, чем аналогичные ферменты животного происхождения. Глюкоамилаза расщепляет крахмал, минуя мальтозу, до глюкозы. Оптимум рН 4,7-4,5. Наряду с высокой активностью ферментов амилолитического комплекса глюкаваморин Пх имеет цитопектолитические ферменты, катализирующие гидролиз гемицеллюлозы, пектиновых и других веществ корма.

Пектаваморин Пх представляет собой высушенную культуру плесневого гриба *Asp. awamori* 16 (влажность не более 13%). В препарате содержится полиметилгалактуроноза, полигалактуроноза, пектинметилэстераза, кислая протеаза, гемицеллюлаза, целлюлаза. Препарат стандартизируется по пектолитическому комплексу (ПКС по интерферометрическому методу – 2,4; 6 и 8 ед/г или по йодометрическому методу соответственно 800, 1600 и 2400 ед. ПкС/г). Указанные ферменты, за исключением кислой протеазы, в организме животных не вырабатываются. Весь комплекс кислотоустойчив, оптимум рН 4,5-3,0. Вследствие сочетания высокой пектиназной активности с целлюлазной и гемицеллюлазной этот препарат исключительно перспективен для применения в животноводстве.

*Краткая технология получения технических ферментных препаратов и их характеристика при глубинном способе культивирования продуцента.* Производство препаратов состоит из следующих стадий: приготовление посевного материала, выращивание его в колбах и инокуляторах, приготовление производственной питательной среды, ферментация в производственных условиях, отделение мицелия, концентрирование, сушка концентрата, получение стандартного препарата и его расфасовка. При глубинном методе выращивания микроорганизмов все процессы механизированы и автоматизированы, их выращивают в толще хорошо аэрированной питательной среды в специальных герметически закрытых ферментерах. Воздух и питательную среду подают в ферментер. Весь процесс проходит в стерильных условиях в течение 48-52 часов при 30-32 °С с постоянной аэрацией и перемешиванием.

Для получения ферментных препаратов мицелий отделяют на вакуум-фильтре, а фильтрат, содержащий ферменты, упаривают до концентрации сухих веществ 15-18% и направляют на распылительную сушилку для получения технического препарата. Препараты выпускают с содержанием комплекса ферментов. Большинство высушенных препаратов устойчивы. В некоторые препараты добавляют стабилизирующие вещества (сахар, крахмал, белковые вещества, соли и др.).

По описанной технологии с учетом некоторых особенностей питательной среды и технологических параметров производят амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх, пектаваморин ГЗх, ксилаваморин ГЗх, лизосубтилин ГЗх и т.д.

Таблица 23

Нормы введения ферментных препаратов в комбикорма, %

Препараты	Поросята 0-2 мес	Поросята 2-4 мес	Подсвинки на откорме	Свино матки	Цыплята 5-30 дн г/т	Куры - несу шки г/т
Амилоризин П10х	0,01	-	-	-	100	200
Глюкаваморин П10х	0,02	-	-	-	200	300
Глюкаваморин Пх		0,2	0,2	0,5	-	-
Амилосубтилин ГЗх	0,05	0,05	0,05	0,05	500	300
Протосубтилин ГЗх	0,03	0,03	0,03	0,05	500	300
Пектофоэтидин Г10х	-	-	-	-	100	200

Амилосубтилин ГЗх – это порошок, полученный при выращивании культуры *Bac. subtilis* 103 глубинным способом. Содержит  $\alpha$ -амилазу, нейтральную и слабощелочную протеазы,  $\beta$ -глюканазу, литические ферменты. Стандартизируют по амилазной активности (600 ед/г). В бактериальной  $\alpha$ -амилазе в отличие от других, помимо кальция, содержится цинк. Оптимум pH 6-6,5.

Протосубтилин ГЗх представляет собой порошок, полученный при выращивании культуры *Bac. subtilis* 103 глубинным способом. Содержит нейтральную и щелочную протеазы,  $\alpha$ -амилазу,  $\beta$ -глюканазу. Стандартизируется по нейтральной протеазе (ПС 200 ед/г препарата). Протеолитический комплекс, кроме протеиназ, включает большое количество пептидаз, поэтому спектр его действия значительно шире, чем пепсина, трипсина и химотрипсина вместе взятых. Оптимум pH 7,5-6,0. Он проявляет свою каталитическую способность в верхних слоях желудочного содержимого, где пепсин не работает из-за высокого показателя pH, трипсин и химотрипсин отсутствуют.

Пектаваморин ГЗх – порошок, полученный при выращивании культуры *Asp. Awamori* 16 глубинным способом. Содержит полигалактуроназу, полиметилгалактуроназу, пектинметилэстеразу, гемицеллюлазу, кислую протеазу. Стандартизируют по общей пектолитической активности (3 ед/г препарата по интерферометру или 1000 ед/г по йодометрическому методу).

Комплекс пектиназ кислотоустойчив, оптимум pH 4,6-3,0.

Ксилаваморин ГЗх – порошок, полученный путем выращивания культуры *Asp. Awamori* 16 глубинным способом. Содержит гемицеллюлазу, целлюлазу и пектиназу. Стандартизируют по гемицеллюлазной активности (1000 ед/г). Препарат кислотоустойчив, оптимум pH 5,5-5,0.

Лизосубтилин ГЗх. Новый комплекс ферментов, выпускаемых нашей промышленностью. Литические ферменты широко распространены в природе. Их находят в бактериях, грибах, высших растениях, в организме животных и человека. У животных эти ферменты служат для борьбы с микробным заражением, обеспечивают стерильность внутренней среды организма.

Наибольший интерес для народного хозяйства представляют экстрацеллюлярные литические ферменты с широким спектром действия. Они могут быть обнаружены у организмов, живущих на средах с высоким содержанием органических соединений углерода и азота, так как эти среды являются объектом конкуренции большого числа микроорганизмов. Лизосубтилин ГЗх представляет собой порошок, полученный путем выращивания культуры *Bac. subtilis* 402 глубинным способом. Препарат содержит маннаназу,  $\alpha$ -амилазу, нейтральную и щелочную протеазу. Активность препарата 50000 ед. ЛА/г.

## 9.2. Определение активности трипсина и амилазы содержимого кишечника.

### *Исследование ферментативных свойств поджелудочного сока*

Поджелудочная железа вырабатывает ферменты, действующие на белки, жиры, углеводы. *Протеолитический* фермент *трипсин* выделяется в неактивной форме в виде трипсиногена, который под воздействием энтерокиназы переходит в трипсин. Поджелудочная липаза активируется желчью. *Амилаза* выделяется поджелудочной железой в активной форме. У крупного рогатого скота за сутки отделяется 6-7 л поджелудочного сока, у овец – 360 мл, у свиней – до 8 л, у собак – 200-300 мл.

Цель опыта. Ознакомиться с действием ферментов сока поджелудочной железы.

#### *1. Определение активности трипсина.*

Ход работы. Берут три пронумерованные пробирки. В каждую пробирку наливают по 3-4 мл неактивированного сока. В первую и третью пробирки добавляют по 10 капель кишечного сока или соскоба слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. В первые две пробирки добавляют измельченный фибрин или кусочки мышцы лягушки. В третью пробирку добавляют 2 мл 2%-го раствора пептона. Пробирки ставят в водяную баню или в термостат при температуре 37-39°C на 40-50 мин. Пробирки извлекают из бани (термостата) и проводят с содержимым первой и второй пробирок *биуретовую реакцию*. Для этого к содержимому пробирок добавляют 1-2 мл 10%-го раствора щелочи, 3-5 капель 1%-го раствора медного купороса и взбалтывают. В пробирках, где не произошло расщепление белка, появляется фиолетовое окрашивание. Там, где белок под действием поджелудочного сока расщепился до альбумоз и пептонов раствор окрашивается в розовый цвет.

Розовая окраска в *первой* пробирке свидетельствует о *частичном переваривании белка* (наличие пептидов). Содержимое *второй* пробирки приобретает фиолетовую окраску, что *подтверждает наличие белка*. К содержимому *третьей* пробирки (реакция на аминокислоты) прибавляют 0,5 мл бромной воды. В *присутствии аминокислот* раствор окрашивается в красно-фиолетовый цвет.

#### *2. Определение активности амилазы*

Ход работы. Для определения действия панкреатической амилазы на сырой крахмал и клейстер берут три пронумерованные пробирки, в которые наливают по 3 мл поджелудочного сока. Содержимое второй пробирки кипятят и охлаждают. В пробирки №1 и №2 добавляют по 2 мл 1%-го крахмального клейстера, а в пробирку №3 – 2 мл взвеси сырого крахмала, перемешивают. Пробирки №1 и №2 помещают в водяную баню или термостат при температуре 37-38°C на 15-20 мин, а пробирку №3 – на 30-40 мин. Затем в пробирку №1 №2 добавляют по 3 капли раствора Люголя. Убеждаются в *отсутствии крахмала в первой* пробирке (нет синего окрашивания). Во *второй* пробирке *крахмал есть* (синее окрашивание).

Через 30-40 мин вынимают *третью* пробирку и таким же методом устанавливают *факт переваривания сырого крахмала*.

### **9.3. Методы определения активности ферментов**

- *Спектрофотометрические*. Основаны на поглощении света в определенных участках спектра многими соединениями, являющимися активными группами ферментов, субстратами или продуктами реакции. Положение максимума поглощения при определенной длине волны определяется наличием в исследуемом материале определенных групп – аналитических форм. Для измерения спектров используют специальные приборы – спектрофотометры, фотометрические абсорбциометры и др. Этот метод отличается высокой чувствительностью, быстротой определения, малым расходом фермента и реактивов и позволяет следить за течением реакции во времени. Для этого реакционную смесь помещают в кювету. С помощью спектрофотометрического метода можно измерять непосредственно концентрацию некоторых ферментов (после достаточной очистки) по величине характерных максимумов поглощения прочно связанных коферментов (простетических групп). Необходимо иметь произвольно выбранную единицу фермента, с помощью которой можно было бы количественно выразить чистоту и активность различных фракций. В случае спектрофотометрического метода такой единицей может служить количество фермента, которое вызывает определенное изменение в оптической плотности за определенное время при данных условиях опыта; если определяется продукт реакции, то единицей будет количество фермента, которое вызывает образование определенного количества вещества в минуту. Тогда удельную активность фермента, которая является мерой чистоты ферментного препарата, выражают числом единиц в 1 мг вещества (белка).

- *Колориметрические* (фотометрические). В основе этих методов лежит измерение при помощи визуального или фотоэлектрического колориметра окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии субстрата или продукта действия фермента со специфическими реактивами, которые обычно добавляются в фиксированную опытную пробу, взятую после остановки ферментативной реакции.

- *Манометрические*. Эти методы используются при определении активности фермента в тех случаях, когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии. К таким реакциям относятся главным образом те, которые связаны с процессами окисления и декарбоксилирования, сопровождающимися поглощением или выделением кислорода и углекислоты, а также реакции, в которых выделение или связывание газа происходит в результате взаимодействия продуктов ферментативного превращения с добавленным в систему реактивом. Наблюдение за ходом реакции во времени проводится в специальных приборах – манометрических аппаратах Варбурга.

- *Другие методы.* Сюда относится обширный ряд методов, включающих поляриметрию, вискозиметрию, потенцио- и кондуктометрические измерения.

### *Литература*

1. <http://www.wikimaria.org>
2. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов.-М.:Колос, 2001.-576 с
3. Биохимия : Практикум // Под ред. Кучеренко Н.Е. и др. - К.: Выща школа, Изд-во Киевс. универ., 1988.- 128 с.
4. Винниченко А.Н., Дворецкий А.И. Биопрепараты в животноводстве и растениеводстве.-Днепропетровск:Промінь, 1989.-124.
5. Воронин Е.С., Петров А.М. и др. Иммунология.-М.:Колос, 2002.-408 с.
6. Герасимчук А.В. Связь признаков естественной резистентности с молочной продуктивностью, долголетием и воспроизводительными качествами коров //Повышение генетического потенциала молочного скота.М., 1986.-С.183-188.
7. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов.-Санкт-Петербург: ГИО РД.-2001.-312 с.
8. Довгань В.Б.Оценка качества продуктов животноводства.-2005
9. Ездаков Н.В. Применение ферментных препаратов в животноводстве.- М.: Колос, 1976.-224 с
- 10.Єрьоменко В.І. Гормональний статус та методи оцінки функціональних резервів ендокринної системи у великої рогатої худоби (методичні рекомендації).-Київ, 2001.-45 с.
- 11.Єрьоменко В.І. Природна резистентність, гематологічні показники та методи їх визначення у великої рогатої худоби (методичні вказівки).- 2001.-34 с.
- 12.Кацы Г.Д., Шелест Л.С. Тип шерстного покрыва ягнят и их последующая продуктивность // Овцеводство, - 1981. - № 8. -с. 31 - 32.
- 13.Кацы Г.Д., Буйна П.Н. та інші. Якість яловичини червоної степової худоби та її помісей з м'ясними породами // Вісник сільськогосподарських наук. - 1982. - №2. - с. 38 - 40.
- 14.Кацы Г.Д., Авраменко И.Т., Костров И.Г. Использование шкур скота помесей мясных пород для выработки кож // Кожевенно-обувная промышленность. - 1982. - № 11. - с. 28 -30.
- 15.Кацы Г.Д. Биологическая оценка технологий содержания продуктивных животных // Сельскохозяйственная биология. - 1984. - № 4. - с. 38-40.
- 16.Кацы Г.Д., Кащенко С.А., Транковський А.М. Використання біопроб с/г тварин для екологічного моніторингу // Перший національний конгрес анатомів, гістологів та топологоанатомів, Івано-Франковськ. -1994. -с. 75.
- 17.Кацы Г.Д., Вишницька І.А. Засіб раннього прогнозування рівня молочної продуктивності великої рогатої худоби // Патент на винахід, № 17896 А от 3.06.1997 року.

- 18.Кацы Г.Д., Вишницкая И.А., Комаревцева И.А. Оценка потенциальной молочной продуктивности коров методом ЯМР // Збірник наукових праць Луганського ДАУ, Луганськ. - 1999. - № 4 (11). - с. 75 - 78.
- 19.Кацы Г.Д., Медведєв А.Ю. Будова та якість шкіри у бичків різних генотипів в умовах Донбасу // Збірник наукових праць Луганського ДАУ, Луганськ. - 1999. - № 4 (12). - с. 132 -135.
- 20.Кацы Г.Д. Кожа млекопитающих: теория и практика. - Луганск. - 2000. - 143 с.
- 21.Кацы Г.Д., Рогова Н.В., Коюда Л.И. Стан біологічних систем у тварин чорно-рябої породи за умов тривалої акліматизації // Збірник наукових праць Луганського НАУ, Луганськ. - 2002. - № 15 (27). - с. 8 - 11.
- 22.Кацы Г.Д., Медведєв А.Ю., Вдовіченко Ю.В. Прижиттєва оцінка якості шкіряної сировини у великої рогатої худоби // в кн.: Розведення і генетика тварин, Київ, Аграрна наука. - 2003. - вип. 37. с. 101 - 106.
- 23.Кацы Г.Д., Коюда Л.И. Методы оценки защитных систем организма млекопитающих. - Луганск. - 2003. - 95 с.
- 24.Кугенев П.В., Барабанщиков Н.В. Практикум по молочному делу.-М.: Агропромиздат, 1988.-224 с.
- 25.Лунина А.В. Мясное скотоводство. Москва: Колос. - 1973. - 280 с.
- 26.Мкртчян Ш.А. Продуктивность и естественные защитные силы животных в Алтайском крае: Методические рекомендации.-Новосибирск, 1982.- 126 с.
- 27.Мусяенко Ю.С., Буйная П.Н. Гибридизация в скотоводстве. Киев: Урожай. - 1994. - 164 с.
- 28.Посудін Ю.І., Костенко В.І. Спектроскопія молока.-К.: Урожай, 1994.- 80 с.
- 29.Сачко Р.Г. Вміст сірковмісних сполук у вовні в процесі її річного росту, зберігання та первинної обробки: Автореф. канд. с.г. наук, Львів.-1995.- 18 с.
- 30.Сергеева А.М.Контроль качества яиц.-М.:Россельхозиздат, 1984.-72 с.
- 31.Сидорцов В.И. Контроль качества шерсти М.: Колос, 1974.-154 с.
- 32.Справочник по клинической химии //Под ред. Колба В.Г., Калашникова В.С. –Минск: Беларусь, 1987.-365 с.
- 33.Шелест Л.С., Кацы Г.Д. Прогнозування росту та розвитку ягнят по типу вовнового покриву при народженні // Збірник наукових праць Луганського НАУ. - 2005. - № 48 (71) - с. 19 -27.