

Изменения фракционного состава саркоплазматических и миофибриллярных белков свинины в процессе длительного хранения при низких положительных температурах*

Чернуха Ирина М.¹, Усанова Оксана Е.¹, Грищенко Валерий М.²

Р е з ю м е: Исследовали характер количественного и качественного определения изменений фракций саркоплазматических и миофибриллярных белков при длительном хранении охлажденного мяса (25 сут), упакованного под вакуумом при низких положительных температурах (+4°C).

Исследование супернатантов мышечной ткани показало относительно одинаковое количество растворимого белка (0.63 – 0.64 г белка/100 г мяса) на 12 – 15 сутки хранения и резкое увеличение растворимости (0.64 – 1.68 г белка/100 г мяса) на 15–25 сут холодильного хранения исследуемых образцов. При проведении электрофоретического разделения исследуемых экстрактов обнаружено значительное увеличение количества саркоплазматических и миофибриллярных фракций на 12–25 сутки хранения, что связано с расщеплением белковых молекул с большей молекулярной массой (300–150 kDa). При этом изменяется количественный состав экстрагируемых из мышечной ткани низкомолекулярных белковых фракций (молекулярная масса < 25 kDa).

Ключевые слова: фракции саркоплазматических и миофибриллярных белков, фракционный состав, длительное хранение, электрофоретическое разделение, молекулярная масса.

Введение

При охлаждении, и хранении охлажденного мяса при низких положительных температурах протекают биохимические процессы, оказывающие различное влияние на его качественные показатели. Самые незначительные, иногда еле уловимые изменения в составе или строении компонентов могут оказывать решающее воздействие на свойства мяса, возникающие в процессе созревания. Первостепенное значение имеет изменение белков, определяющих в значительной степени важнейшие качественные показатели мяса.

Фракция саркоплазматических белков, которая состоит из глобулярных белков (миоген, миоглобулин, миоальбумин, глобулин-х, нуклеопротеиды). Состояние саркоплазматических белков не может оказывать прямого непосредственного влияния на качественные характеристики мяса (Иванова и Сергеева, 1983; Соловьев, 1966). Однако изучение их превращений представляет интерес, так как эти белки имеют ферментатив-

ный характер и благодаря этому включаются в биохимические процессы, протекающие в мясе (Гааль и др., 1982; Дэвени и Гергей, 1976).

Содержание миофибриллярных белков (миозин, актин, актомиозин и др.) в мышечной ткани составляет более 50 % от общего содержания азотистых соединений. Их денатурация в целом протекает так же, как денатурация глобулярных белков, т.е. она сопровождается освобождением отдельных радикалов, агрегацией макромолекул белков, снижением их растворимости и другими изменениями.

В настоящее время не выявлены структурные различия распада тканей при созревании мяса под действием тканевых протеолитических ферментов и при длительном хранении при низких плюсовых температурах.

Поэтому очень важно определить, в каком направлении протекают биохимические процессы при автолизе, какие органолептические и физико-химические изменения они вызывают в мясе при его созревании и какие биохимические

*This abstract has been published in the Book of Abstracts from the International 55th Meat Industry Conference held on Tara mountain, 15-17th June 2009.

¹ГНУ ВНИИМП им. В. М. Горбатова Россельхозакадемии, Талалихина 26, 109316 Москва, Россия;

²Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, 142290 Московская, Россия.

процессы протекают при дальнейшем длительном холодильном хранении при низких положительных температурах.

Целью данной работы являлось изучение состояния фракций саркоплазматических и миофибриллярных белков охлажденной свинины в процессе автолитического процесса и созревания охлажденного мяса, в зависимости от сроков хранения.

Материалы и методы

Во ВНИИМПе проводятся комплексные систематизированные биохимические исследования изменений фракционного состава белков мяса свинины при длительном хранении при низких плюсовых температурах. Объектом исследования являются образцы лопаточного отруба свинины в парном и охлажденном состоянии.

Для исследований были подготовлены образцы мышечной ткани, упакованной под вакуумом и заложенные на хранение в условиях низких плюсовых температур $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (Лисицын и др., 2002; Остерман, 1981).

В ходе экспериментальной работы были проанализированы количественные значения фракций растворимого белка. Количественное содержание фракций белков и полипептидов определяли методом Бредфорда (Bradford, 1976).

Было проведено электрофоретическое разделение полученных в процессе экстракции белковых фракций по методу SDS-PAGE.

Электрофорез белковых фракций мышечной ткани свинины проводили в 10 % разделяю-

щем геле в трис-глициновом электродном буфере с pH 8,8 в присутствии SDS (Laemmli, 1970; Schagger и von Jagow, 1987).

Результаты и обсуждение

Проведены биохимические исследования количественного и качественного определения изменений фракций саркоплазматических и миофибриллярных белков, обусловленных процессом созревания, а затем хранением свинины при низких положительных температурах и связь этих показателей с консистенцией мяса.

Исходное содержание белка в мышечной ткани на 0, 5, 12, 15, 20 и 25 суток холодильного хранения свинины составил 18,0, 18,0, 17,0, 18,3, 17,4, 20,0 % соответственно.

Одновременно с денатурационными изменениями белки подвергаются протеолизу – ферментативному гидролитическому расщеплению. Этот процесс протекает под действием целой группы протеолитических ферментов.

Проведено изучение растворимости саркоплазматических и миофибриллярных белков, извлекаемых из мышечной ткани свинины различными по ионной силе буферными растворами (pH 6,8–8,7).

Исследования показали, что в процессе хранения наблюдаются изменения количества растворимого белка саркоплазматической и миофибриллярной фракции белков (рис. 1).

Исходная концентрация растворимых белков в мышечной ткани лопаточного отруба (0

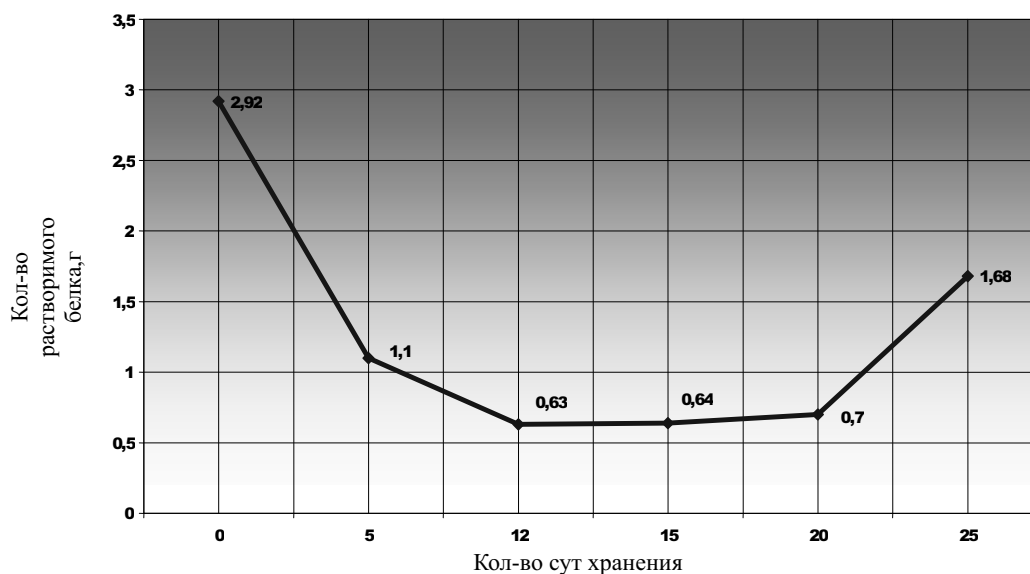


Рис. 1. Количество растворимых белков суммарной саркоплазматической и миофибриллярной фракций (г на 100 г мяса)

сут хранения) составляла 2,92 г в пересчете на 100 г мяса. Содержание в мясе переходящих в экстракт белков максимально сразу после убоя животных (парное мясо-0 сут). Однако в течение 5 сут хранения происходит резкое снижение уменьшение растворимости белка, т.е. переход фракций белка в нерастворимое состояние. Этот процесс усиливается до конца 5–6 сут хранения.

По истечении 5 сут хранения количество белка уменьшается с 2,92 г до 1,1 г, что составляет 48 % от количества в парном сырье.

После прохождения точки минимума начинается процесс разрешения растворимости. На этапе 12–15 сут хранения растворимость находится примерно на одном уровне 0,63 г на 100 г мяса.

На 20 сут холодильного хранения наблюдается небольшое снижение количества белка до 0,7 г.

Приведенные данные по растворимости белков свидетельствуют о том, что в процессе хранения происходят автолитические превращения белков под действием тканевых протеолитических ферментов, а так же происходит изменение соотношения между белками с различными молекулярными массами. Данные по растворимости проведенного исследования подтверждают и соотносятся с результатами изучения показателей седиментации, проведенного Кронманн и Уитерботтом (Kronmann и Winterbottom, 1960).

К окончанию хранения 25 сут количество белка резко возрастает и составляет 1,68 г. Данный процесс полностью связан с развитием микробиальной порчи.

Однако экстрагируемость и растворимость белков не может служить достаточно чувствительным критерием их изменчивости и установления полной картины изменений, происходящих в процессе длительного хранения при низких плюсовых температурах. Для достижения этих целей был применен метод электрофореза SDS-PAGE.

Результаты электрофоретического разделения мышечных белков, извлекаемых трисовым буферным раствором с pH 7.6, из парной и охлажденной свинины показали четкие различия по количественному и качественному составу белковых фракций саркоплазматических и миофибриллярных белков на различных сроках хранения.

Гистограмма гомогенатов мышечной ткани лопаточного отруба бескостного 0,5, 12,15,20, 25 суток хранения при + 4 °С приведена на рис 2.

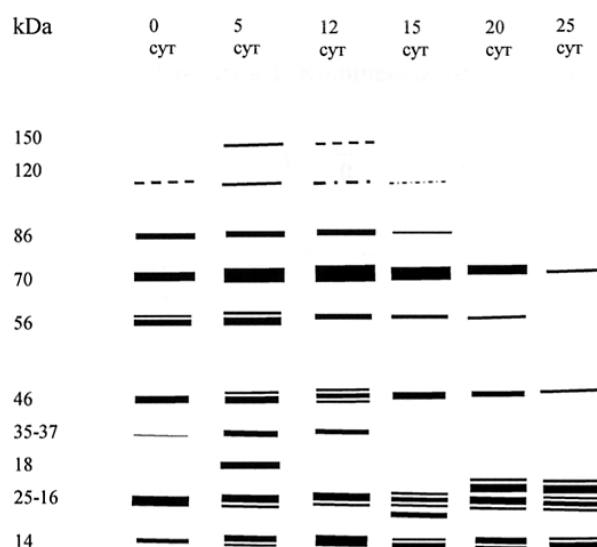


Рис. 2. Гистограмма гомогенатов мышечной ткани лопаточного отруба бескостного 0,5, 12,15,20, 25 суток хранения при +4 °С.

В ней показано распределение белковых фракций на разных этапах хранения охлажденного мяса (0–25 сут).

Количественное распределение белковых фракций описано в табл 1.

Таблица 1. Количественное распределение белковых фракций

Сутки хранения	0	5	12	15	20	25
Молекулярные массы (kDa)						
> 100	1 минор	2	2 минор	1 минор	–	–
100-25	6	7	7	4	3	2
< 25	2	5	3	5	7	8
Суммарное количество фракций	9	14	12	10	10	10

Исследование экстрактов мышечной ткани свинины показало наличие не четко выраженных (минорные полосы на 0, 12 и 15 сут хранения) белковых фракций с молекулярной массой 150 kDa – саркоплазматический белок глобулин-X. Судя по полученным результатам, также наблюдается увеличение количества белка фракции к 12 сут хранения, а затем последовательное уменьшение в экстракте белковой фракции с молекулярной массой 70 kDa, что

соответствует миофибриллярному белку тропомиозину. Такие изменения связаны с увеличением растворимости белковых фракций и, следовательно, большим количеством белкового материала, наносимого на дорожку геля при проведении электрофоретического разделения.

Предполагается, что выявленная фракция с молекулярной массой 35–37 kDa- саркоплазматический белок тропонин-Т.

В процессе созревания и дальнейшего хранения появляются новые белковые фракции (< 25 kDa), обнаруживаемые на электрофореграммах и которые характеризуются более высокой электрофоретической подвижностью.

На электрофореграммах уменьшение количества фиксируемых белковых полос, по-видимому, связано с имеющими место конформационными превращениями саркоплазматических и миофибриллярных белков. В образцах 20,25 сут происходит резкое снижение высокомолекулярных белковых фракций, что связано с выраженным проявлением ферментативной активности ферментов мяса в сочетании с микробиальной порчей и как следствие происходит образование низкомолекулярных фракций белков и пептидов.

В области низкомолекулярных фракций, характеризующихся относительно высокой электро-

форетической подвижностью, обнаруживается значительно большее количество полос на последних сроках хранения охлажденной свинины 8 полос–25 сут.

Анализируя общую картину электрофоретического разделения, можно сделать вывод о том, что определение сроков хранения охлажденной свинины возможно лишь при комплексном изучении растворимости белков с проведением электрофоретического исследования.

Выводы

Проведенные исследования позволили выявить различия в изменении растворимости и состояния фракций мышечных белков охлажденной свинины при длительном хранении при низких плюсовых температурах, что позволит:

- осуществлять определение сроков хранения охлажденного сырья в зависимости от фракционного состава сырья;

- осуществлять рациональную переработку мясного сырья в соответствии с его функционально-технологическими свойствами, определяемыми состоянием белков мышечной ткани.

Библиография

- Bradford M. M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Kronmann M. I., Winterbottom R. I., 1960.** Meat aging and freezing. Post-mortem changes in the water-soluble proteins of bovine skeletal muscle during aging and freezing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8, 1, 67–72.
- Laemmli U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–683.
- Schagger H., von Jagow G., 1987.** Tricine-sodium dodecylsulfate electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368–379.
- Гааль Э., Медьши Г., Верецкеи Л., 1982.** Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 74–113, 212–365.
- Дэвени Т., Гергей Я., 1976.** Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 7–45.
- Иванова Р. П., Сергеева Е. Л., 1983.** Изменения миофибриллярных белков в процессе холодильной обработки и хранения мяса. М.: Холодильная техника, 1, 30–32.
- Лисицын А. Б., Иванкин А. Н., Неклюдов А. Д., 2002.** Методы практической биотехнологии. М.: Изд-во „ВНИИМП“, 46–101.
- Остерман Л. А., 1981.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 285.
- Соловьев В. И., 1966.** Созревание мяса. М.: Пищевая промышленность, 7–160.

Promene frakcionog sastava sarkoplazmatičnih i miofibrilarnih proteina svinjskog mesa tokom dužeg čuvanja pri niskim temperaturama

Černuha M. Irina, Usanova E. Oksana, Griščenko M. Valerij

R e z i m e: Pri hlađenju i čuvanju ohlađenog mesa na niskim temperaturama dešavaju se biohemijski procesi koji različito utiču na pokazatelje kvaliteta mesa. Najmanje, nekad jedva uočljive, promene u sastavu ili građi komponenata nastalih u toku procesa zrenja mogu da imaju glavni uticaj na svojstva mesa. Najveći značaj imaju promene belančevina koje, u visokom stepenu, određuju važne parametre kvaliteta mesa.

Frakciju sarkoplazmatičnih proteina čine globularni proteini – miogen, mioglobilin, mioalbumin, globulin-x, nukleo-proteidi. Stanje sarkoplazmatičnih proteina ne utiče neposredno na kvalitativne karakteristike mesa. Međutim, ispitivanje njihovih promena je veoma značajno, jer pomenuti proteini imaju osobine fermentata, i zahvaljujući tome, učestvuju u biohemijskim procesima koji se odigravaju u mesu.

U radu je ispitan kvalitativni i kvantitativni karakter promena frakcija sarkoplazmatičnih i miofibrilarnih proteina, pri dužem čuvanju ohlađenog mesa (25 dana) u vakuum pakovanju, pri niskim temperaturama (+4°C).

Ispitivanja mišićnog tkiva pokazala su gotovo istu količinu rastvorljivih proteina (0,63–0,64 g belančevina na 100 g mesa) nakon dvanaest do petnaest dana čuvanja i naglo povećanje rastvorljivosti (0,64–1,68 g belančevina na 100 g mesa) u periodu od petnaest do dvadeset pet dana čuvanja uzoraka. Pri elektroforetskom razdvajanju ispitivanih ekstrakata utvrđeno je značajno povećanje količine sarkoplazmatične i miofibrilarne frakcije, posle dvanaest dana čuvanja, što je povezano sa cepanjem proteinskih molekula većih molekulske mase (300–350 kDa). Takođe, menja se i kvalitativni sastav niskomolekularnih proteinskih frakcija ekstrahovanih iz mišićnog tkiva (molekulska masa < 25 kDa).

Ključne reči: frakcije sarkoplazmatičnih i miofibrilarnih proteina, frakcioni sastav, dugotrajno čuvanje, elektroforeza, molekulska masa.

Changes in fractional composition of sarcoplasmic and myofibrillar pork proteins in the process of long-term storage at low positive temperatures

Chernukha Irina M., Usanova Oxana E., Grischenko Valeriy M.

S u m m a r y: The character of quantitative and qualitative determination of changes in sarcoplasmic and myofibrillar protein fractions during a long-term storage (25 days) of cooled meat packed in vacuum at low positive temperatures (+4°C) was investigated.

The equal quantity of soluble protein in samples being investigated (0.63–0.64 g of protein/100g of meat) on days 12–15 and considerable increase in solubility on days 15–25 (up to 1.68 g of protein/100 g of meat) during refrigerated storage was established.

In the process of electroforetic separation of extracts under investigation considerable increase in the quantity of sarcoplasmic and myofibrillar fractions on days 12–25 of storage was determined, what results from the splitting of protein molecules with a greater molecular mass (300–350 kDa). The quantitative composition of low-molecular protein fractions extracted from the muscular tissue (molecular mass < 25 kDa) changes therewith.

Key words: sarcoplasmic and myofibrillar protein fractions, fractional composition, long-term storage, electroforetic separation, molecular mass.

Статья получена: 12.05.2009.

Статья исправлена: 23.06.2009.

Статья принята: 19.08.2009.