

218

XII Европейский конгресс работников НИИ мясной промышленности

Всесоюзный научно-исследовательский институт
мясной промышленности. СССР

К ВОПРОСУ ОБ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ РАЗМЯГЧЕНИЯ МЯСА

В. И. Соловьев, И. А. Шумкова и В. П. Карпова

А Н Н О Т А Ц И Я

Оценка качества препаратов протеолитических ферментов, применяемых в мясной промышленности, осложнена отсутствием надежного метода определения их активности. Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение существующих методов и выяснение возможности использования их для характеристики препаратов – размягчителей мяса.

Подтверждено установленное ранее другими авторами несоответствие между размягчающим действием препаратов на мясо и значениями ферментативной активности. Последняя определяется по ряду известных методов, основанных на применении различных белков-субстратов и измерении концентрации конечных продуктов гидролиза или изменения физико-химических свойств белка.

Предложен метод определения активности с использованием в качестве субстрата белков фракции миозина; но также установлено несоответствие оценки ферментов по разработанному методу и по интенсивности размягчения мяса.

Разработан метод ориентировочной оценки препаратов – размягчителей мяса по результатам определения протеолитической и эластазной активностей.

Установлено ингибирующее влияние хлористого натрия и мясного экстракта на эластазную активность некоторых ферментов – эффективных размягчителей мяса.

Высказано предположение, что причиной указанного несоответствия является ограниченный протеолиз белков, выражающийся не столько в накоплении конечных продуктов, на учете которых основаны методы определения активности, сколько в микроизменениях структуры белка.

ON THE QUALITY EVALUATION OF PROTEOLYTIC ENZYME
PREPARATIONS, USED FOR MEAT TENDERIZATION

Solovyov V.I., Shumkova I.A.,
Karpova V.P.

S U M M A R Y

The evaluation of the quality of proteolytic enzyme preparations used in meat packing industry is complicated due to the lack of a reliable method for their activity determination. The object of the given work was to conduct a comparative study of the available methods and to find the possibility of their utilization to characterize the preparations—meat tenderizers.

A discrepancy, found earlier by other authors, between a tenderizing effect of the preparations on meat and the values for enzymatic activity has been confirmed, the latter being determined by means of a number of recognized methods based on the use of various protein-substrates and on measuring the concentration of the hydrolysis final products or the alterations in protein physico-chemical properties.

A method has been suggested for activity determination using the proteins of the myosin fraction as a substrate; but a discrepancy has been shown for enzymes evaluation by the developed method and by the intensity of meat tenderizing.

A method for an approximate evaluation of meat tenderizing preparations by the results of the determination of proteolytic and elastase activities has been developed.

The inhibiting effect of NaCl and the meat extract on the elastase activity of certain enzymes, which are effective meat tenderizers, has been found.

A suggestion has been made that the above discrepancy is caused by protein limited proteolysis which manifests itself in microchanges of the protein structure rather than in the accumulation of the final products, on the calculation of which methods for activity determination are based.

ZUR FRAGE DER QUALITÄTSBEURTEILUNG VON PRÄPARATEN DER
PROTEOLYTISCHEN ENZYME, DIE ZUM ZARTMACHEN DES
FLEISCHES AMGEWANDT WERDEN

W. I. Solowjow, I. A. Schumkowa,
W. P. Karpowa

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Qualitätsbeurteilung von Präparaten der proteolytischen Enzyme, die in der Fleischindustrie Verwendung finden, ist dadurch erschwert, daß eine sichere Methode zur Bewertung deren Qualität noch fehlt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende Untersuchung der bestehenden Methoden; es mußte auch die Brauchbarkeit derselben zur Bewertung der Fleischzartmacher-Präparate geklärt werden.

Die früher von anderen Forschern festgestellte Diskrepanz zwischen der zartmachenden Wirkung dieser Präparate auf das Fleisch einerseits und den Werten der enzymatischen Aktivität andererseits wurde bestätigt. Die letzte wird mit Hilfe einiger Methoden bestimmt, die sich darauf gründen, daß dafür unterschiedliche Eiweiß-Substrate angewendet werden und Konzentrationen der Hydrolyse-Endprodukte oder Änderungen in physikalisch-chemischen Eigenschaften der Eiweiße gemessen werden.

Es wurde eine Methode der Aktivitätsmessung unter Anwendung von Eiweißen der Myosinfraktion als Substrat vorgeschlagen; jedoch stimmt das Ergebnis der Enzybewertung nach der entwickelten Methode mit der Intensität der Fleischzartmachung nicht überein.

Ein Verfahren zur orientierenden Beurteilung von Fleischzartmacher-Präparaten auf Grund der Messung der Proteolyse- und Elastaseaktivität wurde entwickelt.

Es wurde festgestellt, daß NaCl und das Fleischextrakt die Elastaseaktivität einiger als sehr wirksame Fleischzartmacher bekannter Enzyme hemmen.

Es wird angenommen, daß die Ursache für die besagte Diskrepanz eine begrenzte Eiweiß-Proteolyse ist, die ihren Ausdruck nicht so sehr in der Ansammlung von Endprodukten, deren Menge für die Methoden der Aktivitätsbestimmung ausschlaggebend ist, sondern vielmehr in Mikroänderungen der Eiweiß-Struktur findet.

SUR LA QUESTION DE L'ESTIMATION DE LA QUALITÉ DES PRÉPARATIONS
DES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES POUR L'AMOLLISSEMENT DES VIANDES

V. I. Solovjev, I. A. Shoumkov,
V. P. Karpova

S O M M A I R E

L'estimation de la qualité des préparations des ferments protéolytiques utilisées pour l'industrie des viandes est compliquée de l'absence de la méthode sûre de définition de leur activité. Le but de cette étude c'est l'analyse comparative des méthodes et de la possibilité de les utiliser pour caractériser des préparations amollissantes des viandes.

On a affirmé la non-conformité, de l'influence amollissante des préparations pour les viandes et de la signification de l'activité fermentative définie déjà par d'autres auteurs. Celle-ci était déterminée par des méthodes connues, basées sur l'utilisation des protéines - substratum différents et sur la mesure de la concentration des produits finals de l'hydrolyse ou sur le changement des propriétés physico-chimiques de la protéine.

Nous proposons la méthode de définition de l'activité en utilisant comme le substratum des protéines de la fraction de la myosine; de même nous avons défini la non-conformité de l'estimation des ferments d'après la méthode proposée et l'intensité de l'amollissement des viandes.

La méthode est élaborée pour l'estimation approximative des préparations - amollissantes des viandes d'après les résultats de la définition de l'activité protéolytique et d'élastase.

On a déterminé l'influence inhibitive du chlorure de sodium et de l'extrait de viande sur l'activité de l'élastase de quelques ferments - amollissants efficaces de la viande.

Nous supposons que la cause de cette non-conformité c'est la protéolyse limitée des protéines exprimant non seulement dans l'accumulation des produits finis, dont le contrôle serve la base pour les méthodes de définition de l'activité, mais dans les microchangements de la structure de la protéine.

К ВОПРОСУ ОБ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ РАЗМЯГЧЕНИЯ МЯСА

В.И. Соловьев, И.А. Шумкова, В.Л. Карпова

В последние годы широкое распространение в мясной промышленности получило применение препаратов различных протеолитических ферментов, повышающих нежность мяса. Развивающаяся в ряде стран, в том числе и в Советском Союзе, ферментная промышленность производит значительное количество ферментных препаратов животного, растительного и микробного происхождения. Некоторые из них могут быть использованы в мясной промышленности для улучшения консистенции натуральных полуфабрикатов. Между тем работа с уже известными препаратами, а также выбор новых в значительной степени затруднены отсутствием объективных методов оценки их качества.

Существующие методы оценки ферментативной активности основаны на определении конечных продуктов гидролиза белков.

По развиваемой В.И. Соловьевым и его сотрудниками /1/ теории увеличение нежности мяса в процессе его естественного и искусственного созревания является результатом протеолитических и некоторых других биохимических процессов, происходящих в мышечной ткани. Однако при этом показано, что в процессе созревания мяса имеет место лишь начальная стадия протеолиза мышечных белков. Так, Цендер и сотрудники /2/ установили, что действие папаина на мясо начинается с освобождения растворимых в глицине белков и на первоначальной стадии гидролиза не сопровождается увеличением количества свободных аминокислот. Работами Соловьева В.И. показано также, что при естественном и искусственном размягчении мяса не происходит значительного прироста свободных аминокислот, но отмечаются существенные изменения в структуре белков фракции миозина: наблюдается резкое увеличение числа свободных N - концевых групп /3-4/.

Общеизвестно, что скорость гидролиза и тип гидролиза белка зависят не только от наличия в ферменте примесей и активаторов, pH, температуры, но и от характера самого расщепляемого субстрата.

Протеазы животного, растительного или микробного происхождения не обладают строгой специфичностью, однако, различ-

ные белки гидролизуются ими в неодинаковой степени. Поэтому при определении протеолитической активности фермента выбор субстрата должен учитывать целевое назначение данного препарата. Известны многие методы определения протеолитической активности, которые различаются характером используемого субстрата, а также способом оценки результатов воздействия на него фермента. В качестве субстратов употребляют казеин, гемоглобин, желатин, эдестин, ацидальбумин и другие белки, а также синтетические пептиды.

Результаты переваривания белка под действием фермента чаще всего определяют по приросту в инкубационной смеси количества свободных аминных или карбоксильных групп, по увеличению в безбелковой части пептидов, по нарастанию в безбелковом фильтрате содержания некоторых аминокислот (тирозина, триптофана, аргинина). Последние обнаруживаются по цветным реакциям или по изменению поглощения в ультрафиолетовом свете. Особое место занимают методы, основанные на использовании в качестве субстратов комплексов белков с красителями (азоказеин, нитроказеин, азофибрин и др.), а также на определении скорости свертывания молока и уменьшении вязкости желатина.

Однако как из литературных данных /5-7/, так и из нашего собственного опыта вытекает, что интенсивность воздействия препаратов протеолитических ферментов, определяемая по уменьшению жесткости мяса, непропорциональна их протеолитической активности, установленной по накоплению конечных продуктов расщепления обычно применяемых субстратов.

При оценке ферментных препаратов размягчителей мяса нами предлагалось использовать как обычно применяемые субстраты, так и некоторые белковые компоненты мяса и мышечной ткани. Однако даже использование в качестве субстратов мяса водной вытяжки из мышечной ткани (7), а также мышечной стромы /8,9/, дает с одной стороны мало воспроизводимые результаты в связи с неоднородностью субстратов, с другой стороны не лишено главного недостатка всех указанных методов: отсутствие корреляции активности и размягчения мяса, определяемого органолептически.

Проведенное в нашей лаборатории изучение воздействия некоторых препаратов протеолитических ферментов на ряд белков (табл.1-2) также показало, что даже при определении активности при рН оптимальном для данного фермента, и при рН, близком к реакции среды мяса, пропорциональность получаемых величин и размягчающего действия отсутствует.

Поэтому в дальнейшей работе была предпринята попытка использовать в качестве субстрата лиофилизованные белки фракции миозина, выделенные из мяса по методу Сент-Дьерди, т.е. в относительно чистом виде.

Таблица 1

Сравнительная характеристика протеолитической активности препаратов, определенной различными методами, и эффективности их как размягчителей мяса

Наименование и источник фермента	Субстрат - желатин		Субстрат казеин, метод Лейлянда	Органолептическая оценка размягчения, в баллах
	водно-спиртовое титрование	уменьшение вязкости		
Папаин кавказский	304	1,514	4,5	5
Папаин импортный	304	1,514	4,5	5
Трипсин	1062	3,349	27,0	3,5
Бактериальный № 1	836	2,800	8,48	3,5
Грибной № 1	1042	3,28	17,4	3,5
Грибной № 2	2098	2,997	30,5	2,0
Грибной № 3	1850	2,89	30,4	2,0
Грибной № 4	1480	2,56	13,9	2,0

Таблица 2

Соотношение между протеолитической активностью препарата и органолептической оценкой ферментированного мяса

Ферментный препарат	рН	Протеолитическая активность - воздействие на различные белки - мкг тирозина				Органолептическая оценка эффективности размягчения в баллах
		желатин		гемоглобин		
		на мг препарата	на мг азота	на мг препарата	на мг азота	
Папаин	5,3	857,1	7813,1	70,4	8502,4	5
	5,9	714,2	6510,4	64,0	850,7	
Проназа	7,5	1599,4	16320,4	8659,2	84894	4
	5,9	3084,5	31474,2	5728	53533	
Мезентерин	7,5	742,6	20179,3	3424	93043	2
	5,9	1942,1	54097,4	2736	75164	
Грибной препарат	7,5	400,0	3455,4	729,6	6306,0	3
	5,9	1142,4	11178,0	512,0	5009,7	

Разработанный нами в 1963 г. метод оценки протеолитической активности по воздействию на белок мышечной ткани миозин является также попыткой приближения к количественной оценке образующихся промежуточных продуктов ферментативного гидролиза белка /10/.

Сушность метода сводится к следующему. В определенных условиях суспензия миозина подвергается расщеплению испытуемым препаратом фермента, затем в безбелковом трихлоруксусном фильтрате определяется суммарный прирост промежуточных и конечных продуктов расщепления белка по цветной реакции, предложенной Лоури /11/. Определение активности по предлагаемому методу проводится следующим образом. В контрольные и опытные пробирки вносят по 5 мл 0,2%-ной суспензии миозина в 0,6-М растворе хлористого натрия. Затем их и раствор фермента в фосфатном буфере в течение 3 мин. прогревают на водяной бане при 37°. В контрольные пробирки добавляют по 10 мл 0,3-М раствора трихлоруксусной кислоты, и во все пробирки (контрольные и опытные) доливают по 5 мл раствора фермента. Опытные пробирки инкубируют в течение 20 мин. при температуре 37°, затем в них осаждают белки добавлением 10 мл указанного раствора трихлоруксусной кислоты, и по истечении 10 мин. пробы фильтруют. В пробирки с содержанием 2 мл безбелкового фильтрата для нейтрализации добавляют по 0,5 мл 0,6-н. раствора едкого натра и затем проводят цветную реакцию по Лоури. Активность фермента выражают количеством тирозина, освобожденного из миозина под воздействием 1 мг ферментного препарата. Однако и этот метод не дает необходимой для оценки препарата-размягчителя достаточной корреляции с вызываемым этим ферментом увеличением нежности мяса.

Из ряда работ нашей лаборатории /1, 12/, а также из исследований других авторов /2, 13/ известно, что в процессе созревания мяса и при его ферментации происходят изменения и в белках внутримышечной соединительной ткани. В связи с этим при оценке ферментных препаратов необходимо учитывать и степень воздействия их на белки соединительной ткани: эластин, коллаген и основное вещество.

Проведенное нами изучение ряда препаратов микробного происхождения показало, что только те из них являются эффективными размягчителями мяса, которые одновременно обладают протеолитической и эластазной активностью.

В табл. 3 приведены результаты оценки размягчающего действия (по органолептике) и определения протеолитической и эластазной активностей ряда препаратов. Из анализа приведенных в таблице результатов видно, что все изученные ферменты в различной степени способны воздействовать на миофибрилярный белок - миозин: от 40 до 90 мкг/мг для большинства изучавшихся препаратов, при наиболее сильном его расщеплении протефлином и эластазой. Обращает на себя внимание тот факт, что у различных ферментных препаратов степень интенсивности расщепления миозина и эластина не совпадает.

Воздействие ферментных препаратов микробного происхождения на белки мышечной ткани—
миозин и эластин

Ферментный препарат	Источник выделения фермента	Изготовитель препарата	Воздействие на миозин - мкг продуктов распада в пересчете на тирозин/мг препарата	Воздействие на эластин мг расщепленного эластина/мг препарата	Отношение протеолитической активности к эластазной	Сравнительная органолептическая оценка эффективности размягчения в баллах
1	2	3	4	5	6	7
Эластаза	Поджелудочная железа	Венгрия	140	54,0	2,6	
Проназа	<i>Actinomyces griseus</i>	Япония	79	8,4	9,4	4
Протелин	" "	СССР	82-112	20-31	3,8	5
Кератиназа	<i>Actinomyces fradia</i>	СССР	68	20	3,2	5
	<i>Actinomyces ramosus</i>	СССР	43-60	0,32-0,64	100	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	СССР	65	5	13,0	4

1	2	3	4	5	6	7
Биопраза SP-4	<i>Bac. subtilis</i>	Япония	77	0,48	160,0	3
Субтиноспепти- даза	--	СССР	69	0		0
--	штамм - 192	СССР	69	0,5-2,0	55	3
Мезентерин	<i>Bac. mesentericus</i>	СССР	68-82	0		0
	--	СССР	70	0		0
Терризин	<i>Aspergillus terricola</i>	СССР	54	0		0
Оризин	<i>Aspergillus oryzae</i>	СССР	90	0		0

Отсюда вытекает, что определяющим моментом, характеризующим качество препаратов, предназначенных для размягчения мяса, должно быть наличие способности интенсивно воздействовать как на тот, так и на другой белок мышечной ткани. Вместе с этим, способностью к размягчению мяса обладают лишь некоторые из приведенных препаратов: эластаза, проназа, протелин, кератиназа и другие, то есть препараты, обладающие малой величиной отношения протеолитической активности к эластазной. Поэтому малая величина этого отношения может служить в известной мере критерием при оценке препаратов, предназначенных для размягчения мяса, при условии наличия у них высокой протеолитической и эластазной активностей.

Вместе с тем, некоторые литературные материалы и данные наших исследований показывают, что условия для протеолиза соединительной ткани в мышце ограничены /2/. Действительно оптимум эластазного действия многих ферментных препаратов особенно животного и микробиального происхождения значительно сдвинут в щелочную сторону и весьма далек от реакции среды в мышечной ткани. С другой стороны в мышечной ткани так же, как и в сыворотке крови присутствуют ингибиторы, ограничивающие эластолиз.

Так проведенные нами опыты показывают значительное снижение растворения эластина при добавлении водных экстрактов мышц (табл. 4).

Таблица 4

Влияние концентрации хлористого натрия и мышечного экстракта на эластазную активность

Препарат	Концентрация хлористого натрия (в молях)						Мясной экстракт
	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	
Протелин	100	57,1	30,0	8,2	0	0	82,9
Грибной	100	74,5	45,8	19,9	0	0	68,5
Субтилопептидаза	100	64,2	46,7	19,0	0	0	83,2

Нами также изучалось влияние различных концентраций хлористого натрия на эластазную активность некоторых препаратов, эффективных размягчителей мяса.

Полученные при этом данные подтверждают общеизвестное и для других ферментов ингибирующее действие относительно высоких концентраций солей на эластолиз /14-15/.

Вместе с тем по ряду соображений признано целесообразным введение в мясо вместе с ферментом растворов различных солей. При этом отмечается, что размягчающее действие, оказываемое ферментом, введенным на специальном солевом растворе, в большинстве случаев лучше, чем при введении водных растворов.

Все это позволяет высказать предположение о том, что при размягчении мяса действительно имеет место ограниченный

протеолиз соединительнотканых белков, выражающийся, вероятно, не столько в накоплении конечных продуктов реакции, сколько в микроизменениях конфигурации, структуры белка и в зависящих от этого изменениях его свойств, влияющих на жесткость мышечной ткани.

Не исключена также возможность того, что ферменты, обладающие эластазной активностью, способны воздействовать и на другие компоненты внутримышечной соединительной ткани, в частности мукопротеидную часть.

ВЫВОДЫ

1. Подтверждено установленное ранее другими авторами несоответствие между размягчающим действием препаратов на мясо и значениями ферментативной активности, определяемой по ряду известных методов, основанных на применении различных белков - субстратов и измерении концентрации конечных продуктов гидролиза или изменения физико-химических свойств белка.

2. Предложен метод определения активности с использованием в качестве субстрата белков фракции миозина, но также установлено несоответствие оценки ферментов по разработанному методу и по интенсивности размягчения мяса.

3. Разработан метод ориентировочной оценки препаратов - размягчителей мяса по результатам определения протеолитической и эластазной активностей.

4. Установлено ингибирующее влияние хлористого натрия и экстракта мышц на эластазную активность некоторых ферментов - эффективных размягчителей мяса.

5. Высказано предположение о том, что причиной указанного несоответствия является ограниченный протеолиз белков, выражающийся не столько в накоплении конечных продуктов, на учете которых основаны методы определения активности, сколько в микроизменениях структуры белка.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Соловьев В.И. Созревание мяса, 1966 г.
2. Zender R., Lataste - Bogolle C., Collet R., Rowinski R., Monton R., "Food res.", 23, 3, 1958.
3. Соловьев В.И., Щеголева О.П., Аганова З.А., - "Биохимия", 29, 3, 1964.
4. Соловьев В.И., Щеголева О.П. "Тр.ВНИИМПа" 17, 1964.
5. Weiner S., Mangel M., Mahard L., Reiley G. "Food technol.", 12, 5, 1958.
6. Tappel A.L., Myda D.S., Sterling C., Maier V.P. "Food res.", 21, 3, 1956.
7. Wand H., Weir C.E., Birkner M., Ginger B. "Food res.", 23, 5, 1958.
8. Miller M., Kastelio J. "Agric. food chem.", 4, 6, 1956.
9. Елманов С.Ф. К вопросу о размягчении жестких частей туши крупного рогатого скота. Дисс., 1963.
10. Соловьев В.И. и др. Методы определения активности ферментных препаратов, сб. "Применение протеолитических ферментов в производстве мясных полуфабрикатов, 1964.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. "J. biol. chem.", 193, 1, 1951.
12. Кузнецова Г.Н. Исследование лабильности компонентов соединительной ткани при созревании мяса и обработке его протеолитическими ферментами, дисс. 1964.
13. Лобанов Д.И., Елманов С.Ф. "Вопр.питания", 5, 1961.
14. Morihara K. "J. bacteriol.", 88, 3, 1964.
15. Oakley C.L., Vanerull N.G. "J. pathol. a. bacteriol.", 85, 2, 1963.

Зак.216 ВНИИМП