

XIII Европейский конгресс работников НИИ мясной промышленности

Всесоюзный научно-исследовательский институт
мясной промышленности СССР

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛАСТИНА ПРИ СОЗРЕВАНИИ МЯСА И ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

В.И.Соловьев, И.Н.Карпова

А Н Н О Т А Ц И Я

До сих пор существовало мнение, что один из основных белков соединительной ткани — эластин не претерпевает никаких изменений при созревании мяса. Нам не удалось также найти в литературе сведений о том, каким биохимическим изменениям подвергается эластин внутримышечной соединительной ткани под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов, применяемых для улучшения консистенции мяса.

Из ферментов животного происхождения только у панкреатопептиазы Е была обнаружена способность растворять эластин.

Нами были выделены при pH 5,6 катепсины мышечной ткани. У этого комплекса ферментов, наряду с протеолитической активностью, впервые была найдена сравнительно невысокая, но отчетливо выраженная эластазная активность.

При исследовании действия катепсинов на чистый эластин, полученный из парного мяса, обнаружено увеличение N-концевых остатков с этим изучавшихся аминокислот более чем в три раза. Одновременно с этим появляются растворимые продукты распада эластина.

Впервые установлено, что на всем протяжении процесса созревания мяса происходят структурные изменения в эластине внутримышечной соединительной ткани, остающемся в нерастворимом состоянии. Эти изменения выражаются в увеличении в нем количества N-концевых групп ряда аминокислот на 68%. Количество растворимых продуктов эластолиза увеличивается в процессе созревания мяса почти в два раза.

Под действием искусственно вводимых фибрина и протеазы *Streptomyces griseus*, препаратов протеолитических ферментов, с успехом применяемых для ускоренного созревания мяса, в эластине, выделенном из внутримышечной соединительной ткани такого мяса, происходит накопление N-концевых групп тех же аминокислот, что и при его естественном созревании. Общее их количество после обработки фибрином увеличивается на 82%, а протеазой *Streptomyces griseus* - на 43% по сравнению с необработанными образцами. Одновременно количество растворимых продуктов распада эластина увеличивается на 147 и 13% соответственно.

Все это указывает на однотипность протеолитических изменений, претерпеваемых эластином внутримышечной соединительной ткани при естественном созревании мяса и под действием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов.

Наши исследования показали, что обусловленная эластином жесткость мяса не может рассматриваться в процессе созревания мяса как постоянная величина. Кроме того, как при естественном, так и при искусственном созревании мяса происходит увеличение его питательной ценности благодаря переходу части эластина в растворимое состояние.

ELASTIN CHANGES DURING MEAT AGEING AND AS EFFECTED BY SOME
PREPARATIONS OF PROTEOLYTIC ENZYMES

V.I. Solovyov, I.N. Karpova

S U M M A R Y

Up to now there was an opinion that one of the main proteins of the connective tissue, elastin, does not at all change during meat ageing. We did not manage to find the data, available in literature, on the biochemical changes of the elastin of the intramuscular connective tissue effected by artificially injected proteolytic enzymic preparations used to improve meat consistency.

Out of the enzymes of the animal origin, only pancreatopeptidase E revealed the ability to dissolve elastin.

At pH=5.6 we isolated muscular cathepsins. This complex of enzymes has first been found to possess, along with the proteolytic activity, a relatively low but clearly pronounced elastase activity.

When studying catheptic action on the pure elastin obtained from fresh warm meat, we found a more than 3-fold increase of the N-terminal residues of the six amino acids investigated. Simultaneously, soluble products of elastin breakage appear.

It has been established for the first time that throughout the whole meat ageing process there occur structural changes of the intramuscular connective tissue elastin which remains insoluble. These changes are reflected in a 68% increase of the N-terminal group contents of a number of amino acids. The amount of elastolysis soluble products has a nearly two-fold rise during meat ageing.

Under the influence of artificially injected ficin and protease *Streptomyces griseus* (proteolytic enzymic preparations) successfully used for accelerated meat ageing, the elastin, isolated from the intramuscular connective tissue, accumulates N-terminal groups of the same amino acids as during natural meat ageing. Their

total amount after ficin treatment rises by 82% and after protease *Streptomyces griseus* treatment - by 43% as compared to the untreated samples. At the same time the quantity of the soluble elastin breakage products increases by 147 and 13% (respectively).

All this indicates the similarity of the proteolytic changes undergone by the elastin of the intramuscular connective tissue during both natural meat ageing and that effected by artificially injected preparations of proteolytic enzymes.

Our studies showed that meat rigidity due to elastin could not be considered as a constant value during meat ageing. In addition, during both natural and induced ageing of meat its nutritive value increases due to elastin partial conversion into the soluble state.

DIE VERÄNDERUNGEN VON ELASTIN BEI DER FLEISCHREIFUNG UND
UNTER DER EINWIRKUNG EINIGER PROTEOLYTISCHEN FERMENTPRÄPARATE

W.I. Solowjew, I.N. Karpowa

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

Bis jetzt wurde die Meinung vertreten, daß einer der Haupt-eiweißstoffe - Elastin keine Veränderungen bei der Fleischreifung erfährt. Wir konnten auch keine Literaturangaben darüber finden, welche biochemischen Veränderungen Elastin des intramuskulären Bindegewebes unter der Einwirkung von künstlich eingeführten proteolytischen Fermentpräparaten erleidet, die für die Besserung der Fleischkonsistenz verwendet werden.

Unter den Fermenten tierischer Herkunft wurde nur bei Pan-kreatopentidase E das Elastin-Lösungsvermögen nachgewiesen.

Bei pH 5,6 wurden Kathepsine des Muskelgewebes isoliert. Neben der proteolytischen Aktivität wurde bei diesem Fermentkomplex eine verhältnismäßig niedrige, aber ausdrückliche Elastaseaktivität zum erstenmal festgestellt.

Bei der Untersuchung der Kathepsinwirkung auf das aus dem schlachtwarmen Fleisch gewonnene Elastin p.a. wurde eine mehr als dreifache Zunahme der N-Endgruppen von 6 untersuchten Aminosäuren beobachtet. Gleichzeitig entstehen lösliche Abbauprodukte von Elastin.

Es wurde zum erstenmal festgestellt, daß sich das Elastin des intramuskulären Bindegewebes während der Fleischreifung strukturell ändert, wobei es im unlöslichen Zustand bleibt. Diese Änderungen finden ihren Ausdruck in der Zunahme der Zahl von N-Endgruppen bei einigen Aminosäuren um 68%. Die Menge der löslichen Elastolyseprodukte vergrößert sich im Laufe der Fleischreifung fast ums Zweifache.

Unter der Wirkung von künstlich eingeführten Fizin und Protease *Streptomyces griseus* (proteolytische Fermentpräparate, die für eine beschleunigte Fleischreifung mit Erfolg verwendet werden)

wird im Elastin, das aus dem intramuskulären Bindegewebe eines solchen Fleisches isoliert worden ist, die Anreicherung der N-Endgruppen derselben Aminosäuren festgestellt, wie es auch bei der naturellen Fleischreifung der Fall ist. Die Gesamtmenge von N-Endgruppen wird nach der Bearbeitung mit Fizin um 82% und nach der mit *Streptomyces griseus* um 43% größer im Vergleich zu der Kontrolle. Gleichzeitig nimmt auch die Zahl der löslichen Abbauprodukte von Elastin entsprechend um 147 und 13% zu.

All das zeugt von der Übereinstimmung der proteolytischen Veränderungen, welche Elastin des intramuskulären Bindegewebes bei der naturellen Fleischreifung und unter der Wirkung von künstlich eingeführten proteolytischen Fermentpräparaten erfährt.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß die durch Elastin bedingte Fleischzähigkeit während der Reifung als Konstante nicht angesehen werden kann. Der Nährwert des Fleisches steigert sich bei dessen naturellen sowie auch bei künstlichen Reifung dank der Umwandlung eines Teiles von Elastin in die löslichen Form.

LE CHANGEMENT DE L'ELASTINE LORS DE LA MATURATION DES
VIANDES ET SOUS L'INFLUENCE DE CERTAINES PREPARATIONS DES
FERMENTS PROTEOLYTIQUES

V.I. Soloviev, I.N. Karpova

S O M M A I R E

Jusqu'ici il existait l'opinion qu'une des protéines principales du tissu conjonctif - l'élastine ne subit aucun changement pendant la maturation des viandes. Nous ne trouvons pas de même dans la littérature des références sur les changements biochimiques de l'élastine du tissu conjonctif intramusculaire sous l'influence des préparations injectées artificiellement, utilisées pour l'amélioration de la consistance des viandes.

Des ferments de l'origine animale seule la pancréatopeptidase était capable de dissoudre l'élastine.

Nous isolâmes au pH 5,6 les cathepsins du tissu musculaire. Dans ce complexe des ferments pareillement à l'activité protéolytiques on découvrit pour la première fois l'activité d'élastase relativement basse mais nettement prononcée.

Lors de l'étude de l'action des cathepsins sur l'élastine pure recue des viandes chaudes on trouva l'augmentation plus qu'à trois fois des résidus N-finaux des six acides aminés étudiés. Des produits solubles de la dégradation de l'élastine apparaissent en même temps.

On établit pour la première fois que pendant toute la durée du procédé de la maturation des viandes les changements structuraux se passent dans l'élastine du tissu conjonctif intramusculaire qui reste dans l'état insoluble. Ces changements sont exprimés par l'augmentation dans l'élastine de la quantité des résidus N-finaux à 68%. La quantité des produits solubles de l'élastolyse augmente lors du procédé de la maturation des viandes presque à deux fois.

Sous l'action de la ficine et de la protéase *Streptomyces griseus* des préparations des ferments protéolytiques, injectées artificiellement et utilisées avec le succès pour

la maturation accélérée des viandes, dans l'élastine, isolée du tissu conjonctif intramusculaire de telles viandes se passe l'accumulation des résidus N-finaux des mêmes acides aminés comme pendant la maturation naturelle. Leur quantité totale après le traitement par la ficine augmente à 82% et par la protéase Streptomyces griseus à 43% en comparaison des échantillons non-traités. En même temps la quantité des produits solubles de la dégradation de l'élastine augmente à 147 et 13% conformément.

Tout cela montre des changements protéolytiques du même type qui se passent dans l'élastine du tissu conjonctif intramusculaire pendant la maturation naturelle des viandes et sous l'action des préparations inoculées artificiellement.

Nos recherches montraient que la dureté des viandes déterminée par l'élastine ne peut pas être considérée lors du procédé de la maturation des viandes comme la constante. Outre cela pendant la maturation naturelle comme pendant la maturation artificielle sa valeur nutritive augmente grâce à la transformation d'une partie d'élastine à l'état soluble.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛАСТИНА ПРИ СОЗРЕВАНИИ МЯСА И ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

В.И.Соловьев, И.Н.Карпова

В настоящее время выяснено, что как при естественном, так и при искусственном созревании мяса под действием протеолитических ферментов происходят увеличение нежности и гидратации мяса и начальная стадия протеолиза мышечных белков фракции миозина /2/.

Дэвей и Джилберт /6/ на основании данных Бодуэла и Пирсона /5/ о наличии транспептидазной активности мышечных катепсинов высказали предположение о том, что, благодаря удлинению пептидной цепи при транспептидации, образование свободных N-концевых групп не может служить показателем степени протеолитического расщепления мышечных белков.

Однако это положение не может быть отнесено к рассматриваемому нами случаю, так как в начальной стадии протеолиза происходят не только качественные изменения состава N-концевых групп, но и значительное увеличение их количества. При транспептидации имеет место образование одних N-концевых групп и исчезновение других, но их суммарное количество должно оставаться неизменным.

Многочисленными исследованиями установлено, что целый ряд известных протеолитических ферментов растительного и микробного происхождения обладает эластазной активностью.

Из ферментов животного происхождения только у панкреатической эластазы (панкреатопептидазы E) была обнаружена способность раставорять чистый эластин. Томас и Партридж /8/, изучая кристаллический трипсин, химотрипсин, пепсин и катепсины почек и селезенки, не смогли найти у них эластазной активности.

До сих пор существовало мнение, что один из основных белков соединительной ткани - эластин не претерпевает никаких изменений при созревании мяса. Нам не удалось также найти в литературе сведений о том, каким биохимическим изменениям подвергается эластин внутримышечной соединительной ткани под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов, применяемых для улучшения консистенции мяса.

Нами был получен по методу Сливинского и сотрудников /7/ ферментный препарат, представляющий собой комплекс протеолитических ферментов мышечной ткани группы катепсинов. Исследования этого препарата проводились только при pH 5,6. У этого комплекса ферментов, наряду с протеолитической активностью, впервые была найдена небольшая, но отчетливо выраженная эластазная активность — 0,5ед.

При исследовании действия катепсинов на чистый эластин, выделенный из парного мяса, обнаружено значительное увеличение N-концевых групп аминокислот эластина, оставшегося в нерастворимом состоянии после трехчасовой инкубации с ферментом. Полученные данные ясно показывают, что при действии катепсинов происходит разрыв пептидных связей в эластине внутримышечной соединительной ткани, о котором мы судили по образованию и накоплению N-концевых групп ряда аминокислот. Особенно увеличивается количество N-концевых групп глицина, серина и лейцина. Общее содержание шести идентифицированных N-концевых аминокислот повышается более чем в три раза.

Одновременно в эластолизате было отмечено появление значительного количества растворимых продуктов распада эластина (до 0,345 в показателях оптической плотности), определяемых по методу Бэнсона и сотрудников /9/.

Изучение изменений эластина внутримышечной соединительной ткани при естественном созревании мяса проводилось на полутушах в условиях, близких к проведению процесса созревания на производстве.

Объектом исследования служил полусухожильный мускул крупного рогатого скота (коровы 5–6 лет I категории упитанности породы симментал) в процессе созревания полутуши в течение 6 суток при температуре 8–10°. Пробы для анализа отбирали из полутуши не позже, чем через два часа после убоя, через двое и шесть суток созревания. В эластине, выделенном из внутримышечной соединительной ткани методом щелочной экстракции, определяли содержание N-концевых аминокислот по методу Сангера /4/, с учетом модификаций, сделанных в нашей лаборатории /3/ (табл. I).

Полученные результаты показывают, что на всем протяжении процесса созревания мяса происходят структурные изменения в эластине внутримышечной соединительной ткани, остающемся в нерастворимом состоянии. Эти изменения выражаются в увеличении в нем количества N-концевых групп ряда аминокислот. Если через двое суток хранения

Таблица 1.

Изменение количества N-концевых групп аминокислот эластана
внутримышечной соединительной ткани при естественном созревании мяса
(в ммольях на 100000 г белка, среднее из четырех опытов)

Аминокислоты	Продолжительность созревания		
	1,5-2 часа	2 сут.	6 сут.
Дикарбоновые кислоты	15 ± 1	14 ± 2	17 ± 3
Глицин	$18 \pm 3,7$	$21 \pm 4,2$	38 ± 15
Серин	$5 \pm 2,2$	$7 \pm 2,2$	$21 \pm 5,5$
Аланин	$16 \pm 5,1$	$20 \pm 4,2$	$22 \pm 5,7$
Лейцин	31 ± 5	$40 \pm 5,8$	$51 \pm 4,5$
Общее количество шести N-концевых аминокислот	$86 \pm 10,5$	103 ± 13	$145 \pm 18,5$

количество N-концевых аминокислот изменяется очень незначительно, то к концу процесса созревания (через шесть суток) общее содержание шести изучавшихся N-концевых аминокислот повышается на 68%. Разница статистически достоверна ($P > 0,06$). Одновременно с этим происходит постепенное накопление растворимых продуктов распада эластана (табл. 2).

Таблица 2.

Изменение количества растворимых продуктов распада эластана
внутримышечной соединительной ткани при естественном созревании мяса
(в показателях оптической плотности)

Продолжительность созревания	Показания нефелометра (среднее из трех опытов)
1,5-2 часа	0,007
2 сут.	0,222
6 сут.	0,433

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что в бульоне, полученном из парного мяса, растворимых продуктов распада эластина практически нет. Они появляются лишь через двое суток хранения, и к окончанию процесса созревания мяса их содержание увеличивается почти в два раза (на 94%).

Для изучения изменений эластина внутримышечной соединительной ткани под действием искусственно вводимых протеолитических ферментов нами были использованы следующие препараты: фицин - препарат протеолитического фермента растительного происхождения, полученный из латекса *Ficus caricae* протелин - препарат протеолитического фермента микробного происхождения, выделенный из культуральной жидкости *Streptomyces griseus* проф. Каверзневой в Институте органической химии АН СССР /1/.

Выбор ферментных препаратов был не случайным. Проведенные нами испытания воздействия на мясо ряда ферментных препаратов показали, что упомянутые выше ферменты являются наиболее эффективными. Эти препараты обладали также значительной протеолитической и эластазной активностью (табл. 3).

Таблица 3.

Активность ферментных препаратов, используемых для искусственного созревания мяса

Ферментный препарат	Протеолитическая активность (мкг продуктов распада в пересчете на тирозин/мг препарата)	Эластазная активность (мг расщепленного эластина/мг препарата)
Фицин	I 100 - I 150	10
Протелин	6 000 - 6 800	18 - 20

Об изменениях эластина внутримышечной соединительной ткани под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов фицина и протелина судили по накоплению N-концевых групп ряда аминокислот (табл. 4).

Анализируя полученные данные, мы можем заключить, что при искусственном созревании мяса в эластине, выделенном из внутримышечной соединительной ткани такого мяса, происходит накопление N-концевых групп тех же аминокислот, что и при его естественном

созревании. Общее их количество после обработки фицином увеличивается на 82%, а протелином — на 43% по сравнению с необработанными образцами.

Таблица 4

Изменение количества N-концевых групп аминокислот эластина внутримышечной соединительной ткани под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов (в ммольях на 100000 г белка, среднее из четырех опытов)

Аминокислоты	2-суточное мясо		
	не обработанное ферментом	обработанное фицином	обработанное протелином
Дикарбоновые кислоты	14 ± 2	$15 \pm 2,8$	$15 \pm 1,2$
Глицин	$21 \pm 4,2$	$49 \pm 8,5$	38 ± 5
Серин	$7 \pm 2,2$	$18 \pm 12,7$	23 ± 6
Аланин	$20 \pm 4,2$	37 ± 10	$32 \pm 8,5$
Лейцин	$40 \pm 5,8$	69 ± 5	$46 \pm 10,8$
Общее количество шести N-концевых аминокислот	108 ± 18	$188 \pm 8,5$	$149 \pm 10,8$

Одновременно количество растворимых продуктов распада эластина увеличивается на 147 и 13% соответственно (табл. 5).

Разница статистически достоверна ($P = 0,05$).

Все это указывает на однотипность протеолитических изменений, претерпеваемых эластином внутримышечной соединительной ткани при естественном созревании мяса и под действием искусственно вводимых в него препаратов протеолитических ферментов.

Таким образом, наши исследования показали, что обусловленная эластином жесткость мяса не может рассматриваться в процессе созревания как постоянная величина. На различных этапах созревания мяса в эластине внутримышечной соединительной ткани, остающемся в нерастворимом состоянии, наблюдаются тем более глубокие структурные изменения, чем глубже зашел процесс созревания.

Таблица 5.

Изменение количества растворимых продуктов распада эластина внутримышечной соединительной ткани под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов (в показателях оптической плотности)

2-суточное мясо	Показания нефелометра (среднее из трех опытов)
Не обработанное ферментом	0,222
Обработанное фицином	0,550
Обработанное протелином	0,252

Изучение изменений эластина внутримышечной соединительной ткани под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов фицина и протелина показывает, что эти ферменты вызывают более интенсивный разрыв пептидных связей, выражающийся в увеличении N-концевых групп тех же аминокислот, чем в естественном созревании.

По общему содержанию N-концевых групп аминокислот эластина, выделенный из мяса после обработки протелином, сходен с эластином созревшего мяса (после шести суток хранения). Фицин обладает гораздо большим воздействием на эластин внутримышечной соединительной ткани. Содержание N-концевых групп шести идентифицированных аминокислот в таком эластине в 1,5 раза выше, чем в эластине созревшего мяса.

Такие изменения не могут не отразиться на физических и физико-химических свойствах эластина. Эластин внутримышечной соединительной ткани, оставшийся в нерастворенном состоянии после действия протеолитических ферментов, по своему строению существенно отличается от исходного.

Кроме того, установленное нами образование растворимых продуктов протеолитического распада эластина свидетельствует о количественном уменьшении его содержания в мясе, что также должно рассматриваться в качестве одной из основных причин улучшения консистенции мяса.

Следует также отметить, что как при естественном, так и при

искусственном созревании мяса ^{может} происходить увеличение его питательной ценности, благодаря переходу эластана в растворимое состояние.

ВЫВОДЫ

1. Установлен факт эластазной активности у мышечных катепсинов.
2. Впервые обнаружено, что при созревании мяса происходят структурные изменения в эластине внутримышечной соединительной ткани, остающемся в нерастворимом состоянии. Эти изменения выражаются в увеличении в нем количества N-концевых групп шести изучавшихся аминокислот на 68%.
3. В процессе созревания мяса образуются растворимые продукты распада эластана. Их количество к концу процесса созревания увеличивается почти в два раза.
4. Под воздействием искусственно вводимых препаратов протеолитических ферментов происходят более интенсивные изменения эластана.
5. Все эти изменения указывают на то, что обусловленная эластином жесткость мяса не может рассматриваться в процессе созревания мяса как постоянная величина.

Л и т е р а т у р а

1. Каверзнева Е.Д., Рассулин Ю.А. "Биохимия", 29, 1964, 1042.
2. Соловьев В.И. Созревание мяса, изд. "Пищевая промышленность", М., 1966.
3. Соловьев В.И., Щеголева О.П., Агапова З.А. "Биохимия", 29, 1964, 393.
4. Sanger F. "Biochem. J", 39, 1945, 507.
5. Bodwell C.E. & Pearson A.M. "J. Food Sci.", 29, 1964, 602.
6. Davey C.L. & Gilbert K.V. "J. Food Sci.", 31, 1966, 135.
7. Sliwinski R.A., Doty D.M. and Landmann W.A. "J. Agric. Food Chem" 7, 1959, 788.
8. Thomas J. & Partridge S.M. "Biochem. J", 74, 1960, 600.
9. Yenson M., ÖzH., Baban N. "Nature", 204, 1964, 473.