

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ С 18
ФИЦИНА, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

В.И. Соловьев, В.З. Кракова

Препараты протеолитических ферментов различного происхождения применяются в мясной промышленности для улучшения качества мяса, размягчения его.

Эффективными размягчителями мяса являются препараты протеолитических ферментов, получаемые из тропических растений: папайи, Фицина, бромелина. В нашей стране перспективным источником сырья для выработки растительных протеиназ может служить инжир, из латекса которого получают протеолитический фермент фицин.

Роббинс /1,2/ подробно исследовал ферментативные свойства белка из латекса инжира и дал ему название фицин. В кристаллическом виде фермент был выделен Уолти /3/. Детальное изучение различных препаратов фицина из латекса было проведено Уайтейкером /4/. Химические свойства фицина хорошо изучены /5,6,7,8,9/.

В литературе имеются сведения, что фицин не является гомогенным белком и в нем содержится несколько белковых фракций, обладающих протеолитической и эластолитической активностями /10,11/. Мэзинг и Ван Иесс /12/ анализировали ряд неочищенных препаратов фицина с помощью электрофореза и нашли в них пять компонентов.

Добыча латекса требует больших затрат труда, что ограничивает масштабы его применения, несмотря на высокую активность получаемых из него препаратов.

Исследования, проведенные во ВНИИ мясной промышленности показали, что препарат фицина может быть получен не только из латекса, но и сока, отпрессованного из листьев и неодревесневших побегов этого дерева.

Таблица 4

ДАННЫЕ О БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ИХ ХРОНИЧЕСКОГО ПРИКАРМЛИВАНИЯ ПИРОФОСФАТОМ/ $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_7$ / - II серия

Группа	Белковые фракции			
	Альбумины	Альфа-глобулины	Бета-глобулины	Гамма-глобулины
Контрольная	40,62	10,90	26,37	15,48
I Подопытная	42,45	20,36	23,06	14,09
II Подопытная	32,48	25,00	23,88	18,78
III Подопытная	21,81	22,62	30,16	25,39
Актуальное отравление	44,62	17,51	22,05	12,71

Таблица 5

данные о переменах радиоактивности крови у крыс, третированных пер орально 1 мл радиоактивного пирофосфата /по 5 мкк/100г. P^{32} / у крыс с предварительно примененным пер орально раствором нерадиоактивного пирофосфата /300 мг/100г. P^{32} /

№ по поряд- ку пробы крови	Время иссле- дования пос- ле примене- ния P^{32}	Радиоактивность крови			
		Контрольные крысы		Подопытные крысы	
		Имп/мин/100 мг	%	Имп/мин/100мг	%
1	30-тая мин.	510	100	428	100
2	1-ый час	691	136	500	117
3	2-ой час	840	165	581	137
4	3-ий "	859	168	567	133
5	4-ый "	892	175	599	140
6	5-ый "	846	166	714	167
7	6-ой "	892	175	759	177

Целью данной работы было сравнительное изучение свойств препаратов фицина, полученных различными методами.

Сырьем для исследования служили отечественные сорта инжира, произрастающие на Апшеронском полуострове: Сары Апшеронский, Кадота, Черный поздний.

Листья и неодревесневшие побеги инжира измельчали на волчке, затем отжимали сок, фильтровали его для отделения механических примесей. Весь процесс проводили при температуре 4–6°C.

Препараты фицина получали из сока листьев инжира:

- а) осаждением белка четырьмя объемами ацетона. Полученный осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе;
- б) высаливанием ферментного белка сернокислым аммонием (45%-ного насыщения). Осадок отделяли центрифугированием, затем диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили.

Латекс получали из инжира сорта Узбекский желтый общепринятый методом. Собранный латекс центрифугированием разделяли на 2 слоя: водный и каучукообразный. Затем водную фракцию лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

Нами также был использован импортный высокоочищенный препарат фицина (Голландия, фирма " Naarden ").

Фицин предназначался для размягчения мяса, поэтому оценку его активности проводили по степени воздействия на белки мяса: миозин и эластин.

Воздействие на миозин определяли методом, разработанным во ВНИИМПе /13/, основанным на измерении количества конечных и промежуточных продуктов распада белка по цветной реакции Лоури /14/. Инкубацию белка с ферментом проводили при 60°C в течение 1 часа. За единицу активности принято количество тирозина, освобожденного из миозина под действием 1 мг ферментного препарата в принятых

Воздействие на белки соединительной ткани оценивали по степени расщепления эластина (ластолитическая активность). При этом использовали несколько модифицированный метод Наутона и сотрудников /15/. Инкубацию эластина с ферментом проводили при 55⁰С в течение 1 часа. Эластолитическую активность выражали (в мг) эластина, растворенного под действием 1 мг фермента в указанных условиях.

Кроме того определяли протеолитическую активность по общепринятыму, менее специфическому для данного случая, методу Ансон-На /16/, используя в качестве субстрата казеин.

В этом случае активность выражали в количестве микрограммов тирозина, освобожденного из субстрата под действием 1 мг фермента за 1 час при температуре 65⁰С.

Химический состав препаратов характеризовали содержанием: азотистых веществ (общего азота, азота белков и небелковых веществ), влаги, углеводов, золы, а также растворимостью и pH водных 1%-ных растворов фицина.

Содержание общего азота определяли минерализацией по Кельдашю с последующим ходом анализа по Конвею; небелковый азот - в фильтрате после осаждения белков трихлоруксусной кислотой.

Азот белков рассчитывали по разности между количеством общего и небелкового азота.

Содержание влаги в препаратах устанавливали высушиванием их до постоянного веса при 105⁰С; минеральных веществ - сухим озолением.

При анализе углеводов определяли редуцирующие сахара в пересчете на глюкозу по методу Хагедорн-Иенсена /17/.

Растворимость определяли путем высушивания на фильтре растворившегося осадка.

Гомогенность препаратов фицина, выделенных из латекса, про-

веряли путем электрофореза на бумаге, используя прибор отечественной марки "УЭФ". Условия проведения электрофореза указаны в примечании к рис. I. После разделения белков бумажную ленту разрезали пополам вдоль и одну из полос использовали для обнаружения числа и расположения белковых фракций, другую - для определения их протеолитической активности. Локализацию белковых фракций и количественное соотношение в них белка выявляли методом Монке /19/. Протеолитическую активность определяли методом Ансона /16/.

Изученные нами препараты фицина значительно различались по протеолитической, так и по эластолитической активностям. Наибольшая ферментативная активность характерна для препаратов из латекса. Образцы фицина, выделенные из сока листьев инжира, по своей активности уступают препаратам из латекса. По мере увеличения степени очистки препаратов фицина величина отношения ЭА x 100
ПА уменьшается. Это свидетельствует о том, что по мере очистки происходит частичное увеличение протеолитической и эластолитической активностей за счет удаления балластных белковых веществ.

В наших опытах не обнаружено тесной корреляции между величинами протеолитической и эластолитической активностей. Это подтверждает данные ряда авторов /18/ об отсутствии зависимости между этими двумя активностями.

Различия в ферментативной активности препаратов в известной мере обусловлены различиями в химическом составе.

Как видно из табл. 2, в препаратах, выделенных из латекса, значительно выше содержание как общего, так и белкового азота и ниже балластных белков, что видно из удельной активности, рассчитанной на миллиграмм белкового азота: импортный образец - 21 714 ед/мг, препарат из латекса отечественного инжира - 14 903 ед/мг (табл. I).

Ферментативная активность препаратов фицина Табл.1

Способы получения препарата	Протеолитическая активность на мг препарата	Удельная активность (субстрат - казеин)	Эластоми-тическая активность (субстрат - казеин) на мг белкового азота	<u>ЭА x 100</u>
	/ПА/	на мг белкового азота	/ЭА/	ПА
<u>Из сока</u>				
Осаждением ацетоном	98	6,4	3 161	0,36
Высаливанием сернокислым аммонием	322	14,0	6 440	1,24
<u>Из латекса</u>				
Лиофильная сушка водного слоя латекса инжира	924	43,6	14 903	1,54
Фирма "Naarden" (Голландия)	2128	86,0	21 714	2,52

Таблица 2

Химический состав препаратов фицина

Способ получения препарата	Азот, %			Влага, Углеводы, вори-стость, рН			
	Общий	Небелковый	Белко-вый	%	%	%	%
Осаждением ацетоном	4,0	0,90	3,10	14,0	14,0	2,5	78,9 6,2
Полученный высаливанием сернокислым аммонием	5,7	0,70	5,0	5,82	3,7	2,8	91 6,6
Полученный путем лиофильной сушки водного слоя латекса инжира	6,75	0,52	6,23	5,73	4,5	3,5	100 5,7
Высокоочищенный /Голландия/ 9,95	0,18	9,77	4,50	2,08	2,8	100	5,6

Меньшую ферментативную активность препарата, полученного осаждением ацетоном, можно частично отнести за счет повышенного содержания влаги (14%), золы (14%) и некоторых других балластных веществ. В остальных препаратах заметных различий в количестве золы и влаги не обнаружено.

Содержание углеводов в образцах фицина колеблется незначительно, в среднем 2,7%, за исключением фицина, выделенного из отечественного латекса - 3,5%.

Препараты из латекса полностью растворимы в воде, и значения pH 1%-ных растворов были около 5,6-5,7. Несколько хуже растворялись препараты, выделенные из сока (79-91%).

Из приведенных данных следует, что ферментативная активность изученных образцов фицина изменялась в зависимости от химического состава препарата, источника сырья и способа получения фицина.

Исследовавшиеся четыре препарата фицина показали способность к размягчению мяса.

Наблюдаемое в наших опытах отсутствие пропорциональности между протеолитической и эластической активностями в препаратах, выделенных разными методами, подтверждает мнение /10,II,I2/ об их гетерогенности. В связи с этим представляло интерес изучить фракционный состав 2 препаратов, выделенных из латекса и обнаруживающих разные уровни ферментативной активности.

Результаты проведенных исследований подтвердили данные о многокомпонентном составе препаратов фицина. В изучавшихся препаратах обнаружено 4-5 фракций, обладающих протеолитической активностью. Распределение активности между фракциями в этих препаратах было неодинаковым: в препарате (рис. I А) основная ферментативная активность была сосредоточена в первой, наиболее подвижной фракции, в препарате из латекса сорта инжир Узбекский желтый (рис. I Б) - активность первой фракции была больше активности

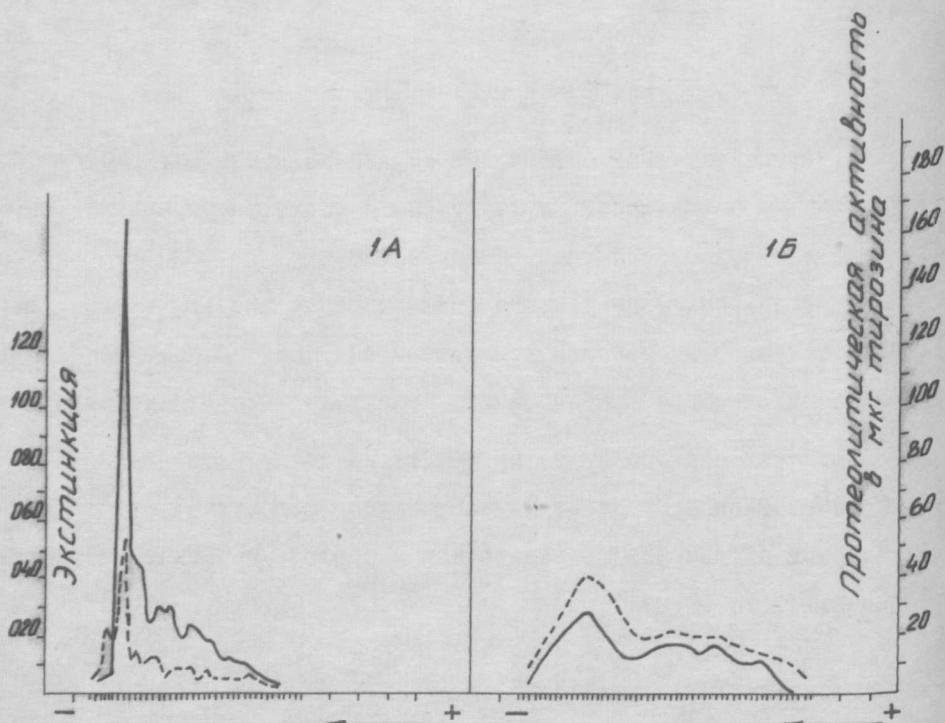
каждой из трех остальных не более, чем на 50%. Следовательно, дальнейшая очистка препарата должна идти в направлении удаления из него фракций, имеющих относительно больший молекулярный вес, т.е. менее подвижных.

ВЫВОДЫ

1. Ферментативная активность изученных препаратов фицина изменялась в зависимости от химического состава препаратов, источника сырья и способа получения фицина.

2. Препараты фицина, выделенные из сока листьев инжира, по ферментативной активности уступают препаратам из латекса инжира. По мере очистки препаратов фицина величина $\frac{\text{ЭА 100}}{\text{ПА}}$ уменьшается.

3. Путем электрофореза на бумаге показана гетерогенность препаратов фицина, выделенных из латекса. Основная часть протеолитической активности сосредоточена в первой, наиболее подвижной фракции.



Фицин из латекса
высокоочищенного
(Фирмы "Naarden")

Фицин из неочищенного
латекса инжира сорта
Узбекский желтый

Рис.1. Электрофорез двух препаратов фицина из латекса инжира:
Ацетатный буфер - 0,2 М уксусной кислоты; 0,02 М уксуснокислого
натрия и 0,003 М свободного основания цистеина; pH - 3,8 /12/;
продолжительность - 18 час; 2,0м/см и 12,5 V/см; — протеолитиче-
ская активность; — содержание белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robbins B.H. Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med., 32, 1935, 892.
2. Robbins B.H., Hamson P.D. "Biol.Chem.", 106, 1934, 725.
3. Walty A. "Amer.Chem.Soc.", 20, 1938, 493.
4. Whitaker I.R. "Food Res.", 24, 1959, 37.
5. Bernhard S.A., Gutfreund H. "Biochem.", 63, 1956, 61.
6. Hienner I.E. "Biochim. Biophys. Acta", 53, 1961, 332.
7. Nakao T. Acta Schol. Med. Univ. Kioto, 29, 1952, 176.
8. Гонавили Ш.Г. "Вопросы питания", 23, 1964, 26.
9. Гонавили Ш.Г., Гонавили М.Ш. "Прикладная биохимия и микробиология", 1, 1965, 640.
10. Valdemiro C. et al. "Biol.Chem.", 239, 7, 1964.
11. Thomas I., Partridge S. "Biochem.", 74, 1960, 600.
12. Ralph Messing, Peter van Ness. "Enzymologia", 23, 4, 1961, 373-379.
13. Соловьев В.И., Шумкова И.А., Карпова В.П. Мамаева С.А. Применение протеолитических ферментов в производстве мясных полуфабрикатов, М., 1964, 38.
14. Howry O.H. et al. "Biol.Chem.", 193, 1951, 265.
15. Naughton M.A., Sanger F. "Biochem.", 70, 1958, 40.
16. Anson M.H. "Gen.Physiol.", 22, 1938, 79.
17. Асатиани В.С. Методы биохимических исследований, М., 1956, 40.
18. Соловьев В.И., Ахмедов Ю.А. Прикладная биохимия и микробиология, 3, 6, 1967, 699.
19. Monke. Klinisch Wochenschrift, 34, 1956, 100.