

О СОВМЕСТИМОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРОТЕИНАЗ И УСИЛЕНИИ
ИХ ДЕЙСТВИЯ НА МЯСО

Д 8

В.И. Соловьев, Г.Н. Кузнецова

В 1959 г. Андеркоффлер сообщал /1/ об успешных работах Американского мясного института по применению смесей растительных, грибных и бактериальных протеиназ длямягчения мяса. С другой стороны, Бавизотто и Миллер в 1960 г. опубликовали сообщение об экспериментах, в которых обнаружен антагонистический эффект при составлении препаратов протеиназ различного происхождения. Авторы испытали препараты по их действию на субстраты гемоглобин и желатин /2/.

Целесообразность приготовления таких смесей очевидна, так как спектр действия различных ферментных препаратов неодинаков. Одни из них обладают высокой протеолитической активностью в отношении полноценных белков мяса, но не оказывают заметного действия на коллаген и эластин; другие обладают специфическим действием на соединительнотканые белки, не обладая достаточной эффективностью в отношении полноценных белков мяса.

Совмещение ферментных препаратов, не имеющих высокой степени очистки и составление комплекса, по-видимому, является далеко непростым вопросом. С другой стороны, введение в высокоактивные препараты протеолитических ферментов чистых препаратов эластазы и коллагеназы было бы дорого. Сложный состав протеолитических ферментов затрудняет разработку теории этого вопроса.

Мы провели некоторые опыты по совмещению протеиназ, содержащихся в:

трипсине производства Рижского мясокомбината;

протеазе из *B. subtilis*, полученной в лаборатории химии мяса ВНИИМПа;

протеазе из *Pen. chrysogenum*, полученной в лаборатории химии мяса ВНИИМПа;

протелина - препарата из *Act. griseus*, Института органической химии имени Зелинского (АН СССР).

В различных соотношениях проверяли следующие пары ферментов:

трипсин + протеаза из *B. subtilis*,

трипсин + протеаза из *Pen. chrysogenum*

трипсин + протелин.

В качестве субстратов для оценки действия испытуемых ферментных препаратов были выбраны структурные белки мышечной и соединительной ткани: миозин и эластин, и хондромукопротеин. Конечные и промежуточные продукты распада миозина определяли по цветной реакции Лоури; эластолитическую активность - по освобождению красителя из конгорт-эластина; мукопротеиназную активность - по нашему методу с использованием трехвалентного лантана для фракционирования продуктов протеолиза.

Метод определения мукопротеиназной активности ферментных препаратов применен для испытания, так как ранее выполненные нами исследования показали: изменения нежности мяса при созревании и обработке протеолитическими ферментами коррелируются с изменениями основного вещества внутримышечной соединительной ткани. Было установлено также, что основное вещество под влиянием вводимых в мясо протеолитических ферментов увеличивает

свою лабильность, и это увеличение неодинаково для различных ферментов. Последнее обстоятельство обусловливает необходимость характеризовать ферменты-размягчители мяса по их действию на основное вещество.

Анализируя немногочисленные литературные данные о составе внутримышечной соединительной ткани, мы пришли к выводу, что субстратом для оценки мукопротеиназного действия должен быть хондромукопротеин. Для препаративного выделения мукопротеина был применен метод Малависта и Шуберта с незначительными модификациями /3/.

При разработке метода определения мукопротеиназной активности мы воспользовались сообщением Догангес и Шуберта о свойствах трехвалентного катиона лантана осаждать нативный хондромукопротеин и утрате этого свойства по отношению к измененному (расщепленному щелочью) мукопротеину. Определение вели в 0,2 м ацетатном буфере pH 5,6, инкубацию с ферментом проводили в течение 30 мин. при температуре 40–45°C. После инкубации реакционную смесь охлаждали до 5°C и прибавляли равный объем насыщенного раствора сернокислого лантана. Через 30 мин. выдержки на холодае осадок отделялся центрифугированием. Контрольные пробы с ферментом не инкубировали.

Для характеристики мукопротеиназного действия можно использовать как осадки, образовавшиеся при взаимодействии с катионом лантана (гравиметрический метод), так и надосадочную жидкость (калориметрический метод – с использованием в качестве реагента антрана).

При изучении совместимости различных ферментных препаратов их навески (при растворении) тщательно растирали, затем

растворы настаивали в течение I часа при комнатной температуре и фильтровали.

Смеси растворов трипсина с растворами других протеиназ в отношении 3:I, I:I, I:3 - по объему составляли перед внесением в реакционную пробирку. Одновременно проверяли действие на различные субстраты исходных растворов обоих компонентов смеси.

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице.

Компоненты смеси	Соотношение трипсина и второго компонента	Переваривание субстратов		
		миозина	эластина	хондромуко-протеина
Трипсин + про-теза <i>B. subtilis</i>	I:0	46,0	0	33,2
	3:I	49,8	3,0	46,3
	I:I	50,4	4,5	54,6
	I:3	53,2	7,0	60,6
	0:I	60,3	II,0	58,8
Трипсин + про-теза <i>Pen. chrysogenum</i>	I:0	63,0	0	49,4
	3:I	61,2	17,0	51,2
	I:I	59,0	25,0	61,1
	I:3	53,2	32,0	55,3
	0:I	46,2	32,0	26,4
Трипсин + про-тезин	I:0	63,3	0	49,0
	3:I	70,5	14,0	75,1
	I:I	86,7	29,0	121,4
	3:I	105,3	39,0	239,0
	0:I	133,0	42,0	686,0

Как видно из таблицы, ни одна из исследованных пар ферментных препаратов не показала усиления переваривания миозина по сравнению с более активным компонентом смеси. Но не было отмечено и уменьшения активности, которое препятствовало бы совмещению исследованных ферментов. Увеличение эластолитической активности пары трипсин+протелин, как было выявлено дополнительными опытами, следует отнести за счет разбавления при определении активности протелина. В паре трипсин+протеаза *Pen. chrysogenum* имеет место усиление эластолитического действия, а совмещение трипсина с протеазой *B. subtilis* оказывает на эластин отрицательное действие.

Наиболее выгодным совмещением препаратов по усилинию их мукопротеиназного действия оказалась пара трипсин+протеаза *Pen. chrysogenum*.

Мы определили, что оптимальная температура переваривания хондромукопротеина ферментной смесью, составленной из трипсина и протеазы *Pen. chrysogenum* (1:1) – 50⁰С, а скорость расщепления хондромукопротеина пропорциональна времени инкубации в первые полчаса; затем она замедляется. Оптимальная температура действия этой пары ферментов на эластин – 50⁰С. Наиболее интенсивно миозин расщепляется при 60⁰С. Через 30–45 мин. от начала инкубации переваривание миозина затормаживается. Это, по-видимому, происходит за счет накопления продуктов распада.

Было установлено, что водный раствор приготовленной ферментной смеси трипсина и протеазы *Pen. chrysogenum* может храниться при комнатной температуре без заметного уменьшения его активности в течение суток, а в первые 4 часа хранения

происходит некоторое накопление активности в растворе, которое не может рассматриваться как результат настаивания. Возможно, здесь имеет место инактивация присутствующих в растворе (содержащихся в исходных ферментных препаратах) ингибиторов.

Дегустационная оценка мяса, обработанного ферментной смесью трипсин + протеаза *Pen. chrysogenum*, была более высокой по сравнению с оценкой мяса, обработанного каждым из компонентов смеси в отдельности.

Наши опыты подтверждают целесообразность использования совмещенных ферментных препаратов в качестве размягчителей мяса.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. - Доклады симпозиума 1-2 октября, Лондон, 1959.
Пищепромиздат, М. 1963
2. Bavisotto V., Miller C., Dewane R. - "Food Res.", 25, 58, 1960
3. Malawista J., Schubert M. - "Biol. Chem." 230, 535, 1958