

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING

N4.

THE XXth EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH INSTITUTES
 THE ALL-UNION RESEARCH INSTITUTE OF MEAT INDUSTRY USSR
 THE RELEASE AND CHANGES IN THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL MUSCLE
 ENZYMES DURING CHILLED MEAT STORAGE
 P.E.PAVLOVSKY, E.I.SIMBIRYOVA

SUMMARY

Lysosomes were isolated by means of differential centrifugation. The rate of releasing various lysosome beef muscle enzymes was studied. Hydrolases total, loose and bound activity was determined.

Studies indicated that, in the process of meat autolysis, lysosome enzymes were released at different rates and that hydrolases concentration was not similar. Differences in the strength of enzyme bonds with lysosome structures were revealed.

RESUME

On a libéré par l'atomisation différentielle les lysosomes on a étudié la vitesse de la libération de différents enzymes lysosomals des muscles du gros bétail; on a déterminé l'activité totale, libre et liée des hydrolases.

Les études ont montré qu'en processus de l'autolyse de la viande la libération des enzymes lysosomals s'effectue à une vitesse différente et la concentration d'hydrolases n'est pas la même. On a révélé la solidité différente des liens des enzymes aux structures des lysosomes.

DER XX. EUROPÄISCHE KONGRESS DER FLEISCHFORSCHUNGSINSTITUTE
 ALLUNIONS-FORSCHUNGSINSTITUT DER FLEISCHWIRTSCHAFT DER UdSSR
 FREIWERDEN UND VERÄNDERUNG DER AKTIVITÄT VON LYSOSOMEFERMENTEN
 DER MUSKEL BEI LAGERUNG DES ABGEKÜHLTEN FLEISCHES
 P.E.PAWLOWSKIJ, E.I.SIMBIREWA

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Differentialzentrifugieren wurden Lysosomen gewonnen. Die Geschwindigkeit des Freiwerdens von verschiedenen Lysosomenfermenten des Muskelgewebes von Rindern wurde studiert. Es wurden die allgemeine, die freie und die gebundene Aktivität von Hydrolasen bestimmt.

Die Untersuchungen ergaben, daß das Freiwerden von Lysosomenfermenten bei der Fleischautolyse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit vor sich geht und die Hydrolasenkonzentration nicht gleich ist. Es wurde eine unterschiedliche Festigkeit der Bindung von Fermenten mit Lysosomenstrukturen nachgewiesen.

XX ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС РАБОТНИКОВ НИИ МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
 ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ СССР
 ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ
 ПРИ ХРАНЕНИИ ОХЛАЖДЕННОГО МЯСА
 П.Е.ПАВЛОВСКИЙ, Е.И.СИМБИРЕВА

АННОТАЦИЯ

Дифференциальным центрифугированием выделяли лизосомы; изучали скорость высвобождения различных лизосомальных ферментов мышечной ткани крупного рогатого скота; определяли общую, свободную и связанную активность гидролаз.

Исследования показали, что в процессе автолиза мяса высвобождение лизосомальных ферментов идет с различной скоростью и концентрация гидролаз неодинакова. Выявлена различная прочность связей ферментов со структурами лизосом.

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING

Нами изучались степень высвобождения гидролитических ферментов из лизосом и изменения их активности в процессе хранения говяжьего мяса (2°C), так как превращения компонентов под действием этих ферментов определяют многие свойства мяса. Гидролазы лизосом влияют на пищевую ценность мяса: ускоряют повышение нежности мяса и накопление продуктов, роль которых важна в образовании вкуса и аромата.

Исследовали длиннейший мускул спины крупного рогатого скота. I. dorel отбирали после убоя у 3-4-летних животных первой категории упитанности, преимущественно симментальской породы и ее помесей.

На всех этапах хранения мышц (2°C) изучали изменение общей, связанной с лизосомами и свободной активности отдельных ферментов. Для определения общей активности фермента, предварительно, в гомогенате ткани разрушали лизосомы неионным детергентом Тритон-Х-100.

Активность фермента, связанную с лизосомами, устанавливали при последующем разрушении липопротеидных мембран. Для этого длиннейший мускул спины очищали от жировой и соединительной тканей, измельчали на мясорубке и готовили 25%-ный гомогенат в 0,25 М сахарозе, содержащий несколько капель КОН в гомогенизаторе. Для сохранения лизосомальных частиц в период гомогенизации определяли время гомогенизации - не более 60 секунд.

Лизосомы выделяли методом дифференциального центрифугирования. Гомогенат центрифугировали 10 мин. при $2500 \times g$ для осаждения неразрушившихся клеток и ядер. Полученную надосадочную жидкость вновь центрифугировали 20 мин. при $8500 \times g$. Центрофугальные силы, применяемые для разделения этой фракции, осаждали митохондрии. Супернатант центрифугировали при $14000 \times g$ для получения лизосомальной фракции, находящейся в осадке.

Определяли активность ферментов в гомогенате, осадке, содержащем лизосомальную фракцию, и центрифугате, после осаждения лизосом, содержащем 4-5 мг азота/0,25 М сахарозы.

Для исследования изменений лизосомальных ферментов во время автолиза мяса определяли три вида ферментативной активности: общую, связанную и свободную. Общую и связанную активности проверяли в гомогенате ткани и в лизосомах после обработки Тритоном Х-100; свободную - в центрифугате после осаждения лизосом.

Активность ферментов определяли на специфических субстратах: катепсина В - методом Калдвэлла и Гройяна /1/, применяя в качестве субстрата бензоил-L-аргининамид; количество аммиака, высвобождающегося ферментативным путем катепсином В, - при помощи реактива Несслера. Активность катепсина В выражена в мкМ аммиака на мг белка за 60 мин;

активность катепсина Д - по Калдвэллу и Гройяну /1/. Активность катепсина Д выражена в мкМ тирозина на мг белка за 60 мин.; активность кислой фосфатазы - "маркера" лизосомальных ферментов - по методу Бауэра /2/, субстратом служил β -глицерофосфат натрия; содержание неорганического фосфора - по Покровскому /3/. Активность кислой фосфатазы выражена в мкМ неорганического фосфора на мг белка за 30 мин.;

активность кислых рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы - по Ромео и Стэгни /4/. Время инкубирования для обоих ферментов составляло час при 37°C . Активность этих ферментов выражена, как разница значений экстинкций на мг белка между исследуемым и контрольным растворами за 60 мин.;

содержание белка - по Лоури.

Распределение и изменение активности ферментов: катепсинов В и Д, кислой фосфатазы, кислых дезоксирибонуклеазы и рибонуклеазы в мышечной ткани показано на рис. 1-3.

В результате исследований установлено, что в процессе автолиза мяса при 2°C , начиная с первых часов, идет высвобождение гидролитических ферментов из лизосом мышечной ткани. При дальнейшем хранении наступает снижение всех активностей ферментов лизосом. Обнаружено, что менее прочно связанным ферментом со структурами лизосом является кислая фосфатаза, затем кислая дезоксирибонуклеаза. Эндопептидазы - катепсины В и Д являются более прочно связанными. В связи с этим различно нарастание свободной активности лизосомальных ферментов мышечной ткани. Так, свободная активность кислой фосфатазы растет с первых часов автолиза мяса и достигает максимальной величины к 24 час., составляя около 50% общей активности (см. рис. 3). Наибольшее высвобождение кислой дезоксирибонуклеазы уже к 24 час. автолиза составляет 80% общей активности (см. рис. 2), тогда как наиболее полное высвобождение кислой рибонуклеазы и катепсина Д наступает к исходу 48 час. автолиза (см. рис. 2, I), а катепсина В - к концу 72 час. автолиза мяса (см. рис. I)

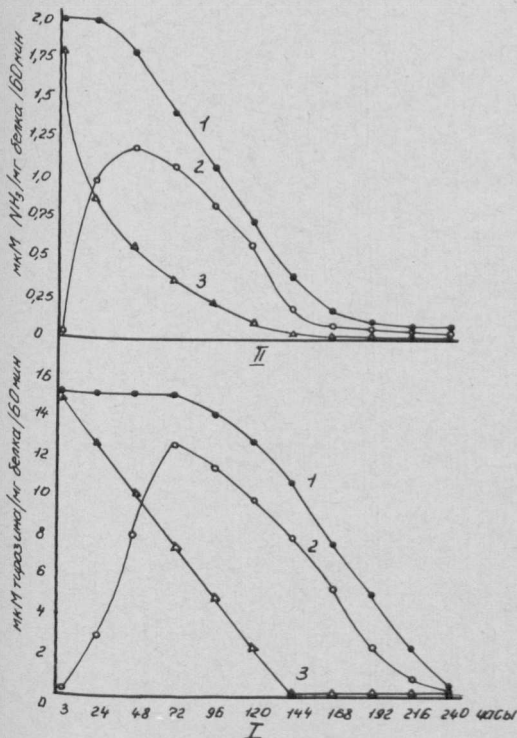


Рис. 1. Изменение общей (I), свободной (2) и связанной (3) активности катепсина Д (I) и катепсина В (II) в процессе автолиза (2°C) мышцы быка

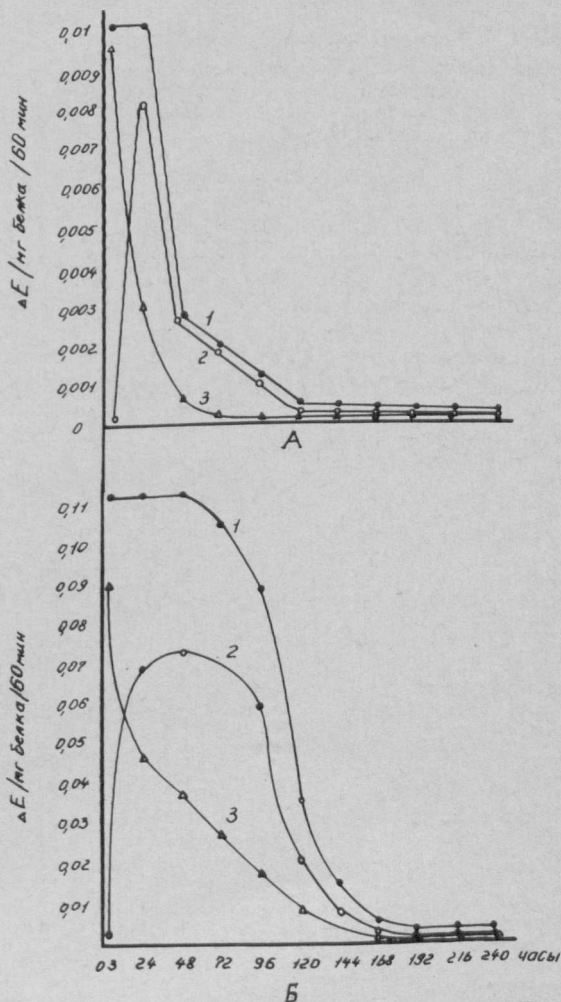


Рис. 2. Изменение общей (I), свободной (2) и связанной (3) активности дезоксирибонуклеазы (А) и рибонуклеазы (Б) в процессе автолиза (2°C) мышцы быка

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING

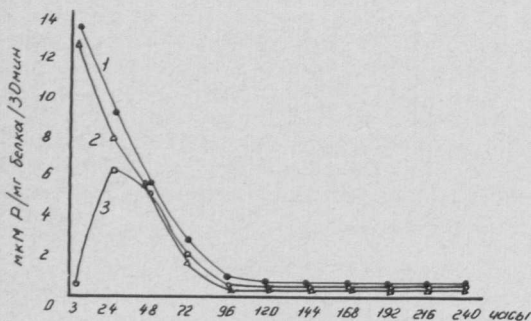


Рис. 3. Изменение общей (1), свободной (2) и связанной (3) активности кислой фосфатазы в процессе автолиза мышцы быка (2°C)

Исследования выявили различное содержание изучаемых лизосомальных ферментов. концентрация катепсина Д в несколько раз выше концентрации катепсина В. Общее содержание дезоксирибонуклеазы является весьма низким по сравнению с другими исследуемыми ферментами. Ее концентрация составляет всего лишь около 9% от концентрации кислой рибонуклеазы (см.рис.2).

Установлено, что в процессе автолиза мышечной ткани лизосомальные ферменты отличаются различной стабильностью. Кислая фосфатаза очень быстро подвергается инактивации (см.рис.3). Минимальная активность ее обнаруживается к концу 4 сут. автолиза. Следует подчеркнуть сравнительно низкую стабильность кислой дезоксирибонуклеазы. Минимальная активность кислой рибонуклеазы и катепсина В выявляется к исходу 8 сут. автолиза мышц. Инактивация катепсина Д наступает намного позднее других ферментов. Минимальная активность катепсина Д обнаруживается к концу 10 сут. автолиза.

ВЫВОДЫ

1. Высвобождение лизосомальных ферментов идет с различной скоростью: наиболее быстро высвобождается кислая фосфатаза. К относительно плохо солюбилизующим ферментам можно отнести катепсины В и Д и кислую рибонуклеазу.

2. Из пяти представленных гидролаз лизосом только катепсин Д и кислая рибонуклеаза имеют высокую концентрацию. Содержание других ферментов относительно невелико.

3. Изученные лизосомальные ферменты имеют неодинаковую стабильность в процессе автолиза, так минимальная активность кислой фосфатазы и кислой дезоксирибонуклеазы устанавливается к концу 4-5 сут., а катепсинов В и Д и кислой рибонуклеазы - к 8 сут. автолиза.

4. При различном выходе концентрации, неодинаковой стабильности лизосом можно ожидать и разный объем автолитических превращений соответствующих компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caldwell K.A., Groi Jean O.K. "J.Agr.Food Chem.", 1, 108, 1971.

2. Bowers W.E., Finkenstaedt I.T., Duve C. "J.Cell Biol.", 32, 1967, 325.
3. Покровский А.А. Химические основы процессов жизнедеятельности. М., "Медгиз", 1962.
4. Romeo D., Stagni N., Stottocasa G.L. "Biochim. Biophys. Acta.", 130, 64, 1966.