

D 5478

Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ И ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**



**Кафедра технологии мясных, рыбных продуктов
и консервирования холодом**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Методические указания
к лабораторной работе № 1 по курсу
«Методы исследования мяса и мясoproдуктов»
для студентов специальности 260301
всех форм обучения

Второе издание, исправленное



Санкт-Петербург 2008

Базарнова Ю.Г., Булова Т.Е., Поляков К.Ю. Определение активности внутриклеточных протеолитических ферментов мышечной ткани: Метод. указания к лабораторной работе № 1 по курсу «Методы исследования мяса и мясопродуктов» для студентов спец. 260301 всех форм обучения / Под ред. Н.А. Уваровой. 2-е изд., испр. – СПб.: СПбГУНиПТ, 2008. – 12 с.

Приведены теоретические положения и метод определения активности катепсинов в мышечной ткани в зависимости от вида, срока хранения и технологической обработки.

Рецензент
С.Н. Горяйнов

Рекомендованы к изданию редакционно-издательским советом университета

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

После убоя животного прекращается обмен веществ и приток кислорода к клеткам тканей. В мясе происходят биохимические процессы: изменяются белковые вещества, обуславливающие изменение нежности мяса, экстрактивные вещества, вызывающие образование и накопление продуктов, которые влияют на вкус и аромат.

Прижизненная роль внутриклеточных протеолитических ферментов многогранна: они участвуют в катаболизме белков и доставке пластического материала для биосинтетических реакций, в образовании и распаде физиологически активных веществ, оказывают прямое воздействие на энзиматический аппарат клетки посредством активации зимогенов или протеолитической модификации самих ферментов и т. д.

В автолитических превращениях мышечной ткани наиболее важное значение имеет деятельность двух основных ферментных систем. Одна из них связана с функцией движения, другая – катализирует непрерывный распад главных структурных элементов мышечного волокна, в том числе актомиозинового комплекса. Главная роль отводится катепсинам.

Изменения в мясе после убоя животного и при хранении вызваны действием тканевых ферментов. Автолитическими процессами называют процессы распада компонентов тканей под влиянием находящихся в них ферментов. После разрешения посмертного окончения в мясе происходят изменения, называемые «созреванием» мяса. Катепсины – кислые протеиназы – проявляют максимальную активность при pH 2,0 – 5,0. Они находятся в органах, тканях и локализованы в лизосомах, которые представляют собой внутриклеточные пузырьки диаметром около 5,5 мкм, ограниченные мембраной.

Катепсины являются типичными протеиназами и вызывают деструкцию высокомолекулярных белков. С деятельностью катепсинов, которые во втором периоде автолиза освобождаются из лизосом и активируются кислой реакцией среды клетки, тесно связаны изменения свойств белков, предшествующие релаксации мышц. Эти биохимические изменения можно разделить на две группы:

1. Изменения экстрактивных соединений, формирующие вкус и запах мяса в желательном направлении, особенно заметные после термообработки.

2. Изменения белковой фракции, которые начинаются с изменения гистологической структуры, консистенции, цвета, способности к гидратации и других качественных показателей.

Здесь играют роль дыхательные ферменты, инактивируемые в результате прекращения дыхания и гидролитические, устойчивые к химическим изменениям среды, связанным с прекращением жизни животного.

Роль оксидаз постепенно снижается из-за возрастающего недостатка кислорода, т.е. в начале созревания в активном состоянии сохраняются ферменты, катализирующие прежде всего гидролиз гликогена (первая фаза созревания). Затем, по мере снижения его содержания в результате действия амилазы и мальтазы, доминируют ферменты, обладающие активностью при $pH = 6,8-7,2$. По мере дальнейшего снижения кислотности ($pH = 5$) возрастает активность протеолитических ферментов (вторая фаза созревания). Эти ферменты не доминируют при жизни животного, зато они участвуют в протеолизе мяса, катализируя все реакции, которые протекают в анаэробных условиях и вызывают изменения азотсодержащих веществ мяса.

Катепсины А, В и С мышечной ткани отличаются тем, что оптимальные условия для их воздействия создаются при низком значении pH , индивидуальном для разных субстратов, на которые они воздействуют.

Действуя на разные субстратные фрагменты, катепсины оказывают существенное влияние на структуру белковых компонентов. Это вносит определённый вклад в диссоциацию образовавшихся на этапе посмертного ооченения белковых агрегатов, ведёт к появлению свободных сульфгидрильных групп и частичному восстановлению свойств мышечной ткани, утраченных в процессе ооченения.

В результате действия катепсинов на белки при правильном развитии автолитических процессов мясо приобретает нежность, сочность, выраженный вкус и аромат. Характер и глубина автолитических изменений в мясе влияют на его качество и пищевую ценность.

Изучение и целенаправленное использование биохимических свойств тканевых ферментных систем необходимы для регулирования и интенсификации технологических процессов получения свежего мяса и продуктов его переработки.

При получении продуктов с заданными свойствами управление технологическими процессами осуществляется путём воздействия на основные ферментные системы мяса внешних факторов: температуры, pH среды и т. д., для чего необходимо знать условия проявления активности катепсинов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Цель лабораторной работы: определить активность катепсинов мышечной ткани на разных сроках хранения.

Объекты исследования: мясо (говядина, свинина, баранина или птица), мышечная ткань различных сроков хранения.

Работа выполняется фронтальным методом тремя группами студентов. Каждая группа исследует мышечную ткань различных сроков хранения. В конце работы сопоставляются результаты, полученные разными группами студентов и делается вывод о протеолитической активности на различных стадиях созревания мышечной ткани. Каждой группой студентов одновременно выполняется не менее трёх параллельных определений с использованием перечисленных ниже реактивов, материалов и оборудования.

Реактивы и материалы

1. Мышцы животных различных видов (говядина, свинина, баранина или птица) и разных сроков хранения массой по 100 г.
2. Дистиллированная вода.
3. Бумажные фильтры.
4. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 4 %-й раствор.
5. Карбонат натрия 0,5 м раствор.
6. Реактив Фолина, рабочий раствор.
7. Раствор белкового субстрата с массовой долей 2 %.

1. Мясорубка.
2. Доски разделочные, ножи.
3. Весы лабораторные.
4. Стаканы стеклянные на 200 мл, воронки стеклянные.
5. Весы лабораторные.
6. Стеклянные палочки, пипетки мерные на 2,5 мл, цилиндры мерные на 50 мл.
7. Пробирки мерные на 20 мл с лабораторным штативом.
8. Гомогенизатор.
9. Термостат.
10. Спектрофотометр.

3. ХОД РАБОТЫ

3.1. Приготовление экстракта катепсинов

а. Мышцы животных различных сроков хранения массой 100 г каждая группа студентов освобождает от жира и прирезей соединительной ткани, измельчает сначала на разделочной доске, затем на мясорубке.

б. Навески измельченного сырья массой $(1,0 \pm 0,1)$ смешивают с дистиллированной водой в стеклянном стакане в соотношении 1:20, перемешивают, затем переносят в гомогенизатор и гомогенизируют в течение пяти минут. После этого экстрагируют внутриклеточные протеолитические ферменты в течение 30-ти минут при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$.

в. Полученный экстракт фильтруют в чистую сухую пробирку с притертой пробкой через бумажный фильтр.

Фильтрат используют в качестве экстракта для дальнейших исследований активности катепсинов. Экстракт хранят при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ не более семи дней.

3.2. Определение протеолитической активности катепсинов мышечной ткани различных сроков хранения

а. Растворы белкового субстрата объемом 2 мл помещают в пробирку вместимостью 20 мл, прогревают в термостате в течение 2–3 минут при температуре 30°C и прибавляют по 2 мл экстракта, приготовленного по п. 3.1. Время фиксируют. Смесь выдерживают 15 минут, а затем для прекращения реакции вносят 4 мл раствора ТХУ с массовой долей 4 %. Содержимое пробирки встряхивают и выдерживают еще 20 минут.

б. Параллельно с опытными образцами готовят контрольную пробу. Для этого реактивы смешивают в обратной последовательности: в пробирку вносят 2 мл ферментного экстракта, 4 мл раствора ТХУ и выдерживают 15 минут, затем добавляют 2 мл раствора белкового субстрата и выдерживают 20 минут.

в. После выдержки продукты реакции фильтруют в чистые сухие пробирки через бумажные фильтры. Полученные растворы используют для дальнейших определений.

г. В другие пробирки отбирают по 1 мл исследуемых растворов и прибавляют по 5 мл Na_2CO_3 , 0,5 М и по 1 мл рабочего реактива Фолина. Смесь встряхивают и выдерживают 20 минут. Оптическую плотность окрашенных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 670$ нм (ширина кюветы 10 мм). Раствором сравнения служит контрольный образец.

Расчет протеолитической активности экстракта катепсинов мышечной ткани производят по формуле:

$$ПА = \frac{4DP}{ТЭ \cdot \tau}$$

где D – оптическая плотность исследуемых растворов; P – степень разведения; $ТЭ$ – тирозиновый эквивалент (оптическая плотность, соответствующая 1 мкмоль тирозина в 1 мл стандартного раствора), определяемый по калибровочному графику (см. прил.); τ – продолжительность гидролиза; $ПА$ – протеолитическая активность экстракта катепсинов мышечной ткани.

Результаты заносят в таблицу.

№	Вид мышечной ткани	№ проб	P	D, отн. ед.	ТЭ, мкмоль/мл	τ, мин	ПА, ед/мин
		1	20				
		2					
		3					

Производят расчет погрешности определения протеолитической активности катепсинов для разных видов мышечной ткани.

3.3. Математическая обработка результатов измерений

1. Рассчитать среднее арифметическое значение протеолитической активности катепсинов для разных видов мышечной ткани – \bar{X} в исследуемых образцах:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i,$$

где n – число измерений.

2. Найти среднее квадратическое отклонение результата измерения:

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n(n-1)}}.$$

3. Определить доверительный интервал при вероятности $\alpha = 0,95$:

$$\Delta \bar{X} = t_{\alpha, n} \cdot S_{\bar{X}},$$

где $t_{\alpha, n}$ – коэффициент Стьюдента.

n	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$t_{\alpha, n}$	12,7	4,3	3,2	2,8	2,6	2,4	2,4	2,3	2,3

4. Округлить значение результата протеолитической активности катепсинов для разных видов мышечной ткани \bar{X} в соответствии с полученной величиной $\Delta \bar{X}$ и занести их значения в таблицу.

5. Найти относительную погрешность измерения протеолитической активности катепсинов для разных видов мышечной ткани $\varepsilon_{\bar{X}}$ (%):

$$\varepsilon_{\bar{X}} = \frac{\Delta \bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100.$$

4. ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

Отчет о лабораторной работе должен содержать следующее:

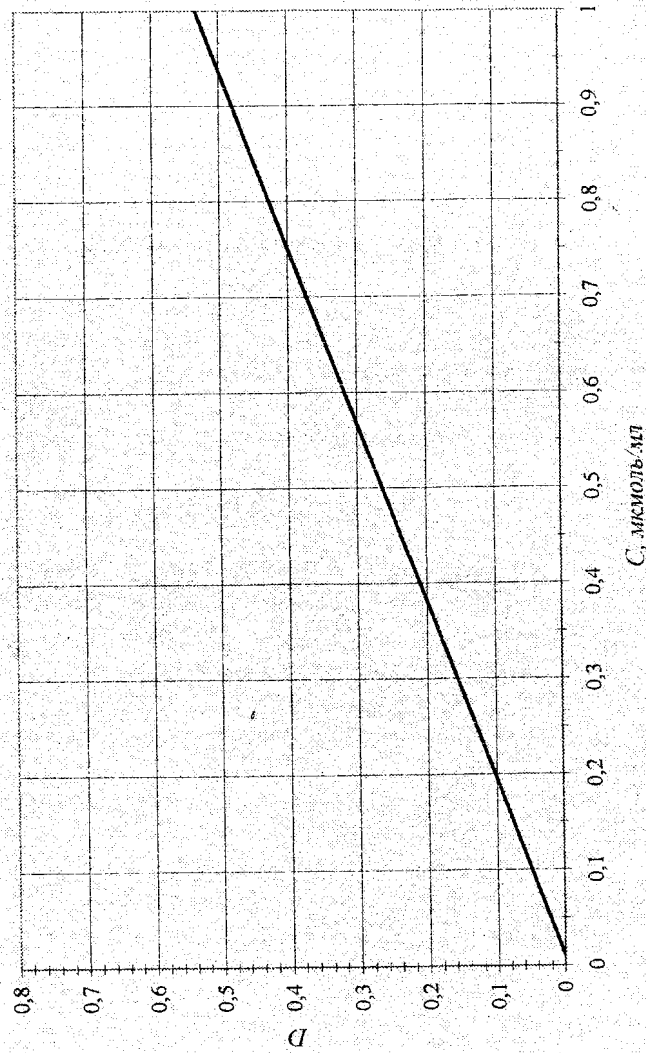
1. Цель работы и краткие теоретические сведения.
2. Описание эксперимента (схема).
3. Таблица с полученными экспериментальными данными.
4. Анализ результатов и выводы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипова Л.В., Геотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – М.: Колос, 2001. – 376 с.
2. Бровко О.Г., Гордиенко А.С., Дмитриева А.Б. и др. Товароведение пищевых продуктов. – М.: Экономика, 1989. – 424 с.
3. Журавская Н.К., Гутник Б.Е., Журавская Н.А. Технический контроль производства мяса и мясопродуктов. – М.: Колос, 1999. – 174 с.
4. Павловский Т.Е., Пальмин В.В. Биохимия мяса. – М.: Пищ. пром-сть. 1975. – 343 с.
5. Парамонова Т.И. Экспресс-методы оценки качества продовольственных товаров. – М.: Экономика, 1988. – 111 с.
6. Рогов И.А., Забашта А.Г., Казюлин Г.П. Общая технология мяса и мясопродуктов. – М.: Колос, 2000. – 367 с.
7. Соловьёв В.И. Созревание мяса (теория и практика процесса). – М.: Пищ. пром-сть. 1975. – 343 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Калибровочный график для определения протеолитической активности катепсинов (по тирозину)



СОДЕРЖАНИЕ

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ	3
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ	5
3. ХОД РАБОТЫ	6
3.1. Приготовление экстракта катепсинов	6
3.2. Определение протеолитической активности катепсинов мышечной ткани различных сроков хранения	7
3.3. Математическая обработка результатов измерений	8
4. ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ	9
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	9
ПРИЛОЖЕНИЕ	

Базарнова Юлия Генриховна
Бурова Татьяна Евгеньевна
Поляков Константин Юрьевич

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Методические указания
к лабораторной работе № 1 по курсу
«Методы исследования мяса и мясoproдуктов»
для студентов специальности 260301
всех форм обучения

Второе издание, исправленное

Редакторы

Е.О. Трусова, Л.Г. Лебедева

Корректор

Н.И. Михайлова

Подписано в печать 03.03.08. Формат 60×84 1/16
Усл. печ. л. 0,7 Печ. л. 0,75 Уч.-изд. л. 0,56
Тираж 50 экз. Заказ № 77. С 49

СПбГУНиПТ. 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9
ИИК СПбГУНиПТ. 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9