

БЕЛКИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СУДАКА¹

О. И. Шапиро и П. П. Карпов
(Белковая лаборатория ВНИРО)

MUSCLE TISSUE PROTEIN OF THE *LUCIOPERCA LUCIOPERCA*
By O. I. Shapiro and P. P. Karpov

Изучение состава и свойств сырья, особенно изучение белков, как основной составной части мяса, имеет большое значение для рациональной постановки разного рода производственных процессов в рыбообрабатывающей промышленности (соление, копчение, маринование и пр.).

В литературе можно наметить два основных направления в подходе к изучению мышечных белков, их классификации, номенклатуры и методов выделения.

Первое направление — это исследователи мышечных белков Kühne, Halliburton, Fürth [9] и др., которые ставили себе целью объяснить физиологические процессы (мышечное сокращение, посмертное окоченение и пр.). Они изучали только белки мышечной плазмы, причем получали ее из измельченных мышц, промытых водой, или физиологическим раствором (NaCl), путем прессования их. Остаток же от прессования, содержащий в себе еще большее количество белка, не подвергался исследованию.

Работы этих авторов, несмотря на некоторые расхождения между ними в отношении номенклатуры и свойств белков, показали, что в состав мышечной плазмы входят в основном два белковых тела типа глобулинов, получивших у разных исследователей разные названия — миозин и белок, свертывающийся при 45° (Kühne), миозиноген и парамиозиноген (Halliburton), миоген и миозин (Fürth). При этом названные авторы склонны были приписывать белкам плазмы главную, если не исключительную, роль в физиологических процессах мышечного волокна.

К другому направлению относятся исследователи, положившие в основу извлечения и разделения мускульных белков различия в их растворимости. Белки извлекались ими из измельченной мышечной ткани путем последовательной экстракции растворами солей, разбавленными кислотами, щелочами и пр. К тому же они изучали не только белки мышечной плазмы, но и не подвергавшиеся раньше исследованию белки, заключающиеся в остатке после выпрессовывания плазмы из измельченных мышц.

Такой методикой пользовались проф. Данилевский [8], Ильин [2 и 3], Умиков [6], Кураев [4], Гесснер [1], Владимирова [13 и 14], Галвяло [10], Ярославцев [7], Прухницкий [5].

¹ В работе по выделению и очищению фракций принимала участие К. Г. Белинская.

Проф. Данилевским было найдено в остатке мышечной ткани, после удаления из нее белков плазмы, новое, характерное для мускульной ткани белковое тело — миостромин; причем Данилевский и некоторые из его учеников именно миостромину приписывали сократительную способность мышечного волокна.

Продолжая работу в этом же направлении, сотрудники Данилевского и последующие исследователи нашли, что при действии на освобожденную от водно-растворимых белков и глобулинов мышечную ткань слабым раствором щелочи или другими растворителями в раствор переходит не одно белковое тело, а группа белков, близких по своим свойствам, но все же имеющих некоторые различия. Таким образом можно предположить, что существует не один белок-миостромин, а и группа миостроминов.

Точно так же было установлено, что растворы средних солей извлекают из освобожденной от альбуминов мышечной ткани группу белков типа глобулинов, состоящую из нескольких белковых разновидностей. Эти белки могут быть объединены под общим названием миозины; они оказываются в основном идентичными с характерными белками мышечной плазмы, изучавшимися Kühne, Halliburton, Fürth.

Обе группы специфических белков мускульной ткани — миозины и миостромины — изучались многими авторами со стороны их элементарного состава, количественного содержания их в разных мышцах, содержания в них нуклеиновой части, органического фосфора, серы и железа и пр. Эти исследования показали, что миозины и миостромины не только отличаются друг от друга степенью своей растворимости, но имеют также различный химический состав.

Характерными для мышечного волокна можно считать две группы белков: миозины и миостромины, составляющие главную массу вещества мускулов. Кроме того в мускульной ткани содержатся альбумины — группа водно-растворимых белков (циркулирующие белки, не принадлежащие самому мышечному волокну, а проникающие в него из плазмы крови), белки сарколеммы, ядер и другие нерастворимые белки, остающиеся в мускульной ткани после извлечения из нее белков остальных трех групп.

Имея целью изучать белки мышечной ткани (мяса) с точки зрения их пищевой ценности и производственных процессов пищевой промышленности, мы не могли пользоваться методикой выделения белков, основанной на выпрессовывании плазмы, так как этот способ не позволяет извлечь полностью миозин и получить белки группы миостроминов. Поэтому мы остановились на способе извлечения и разделения белков растворителями.

В интересах возможной полноты исследования мы считали необходимым включить в план нашей работы изучение не только специфических групп мускульных белков (миозинов и миостроминов), но также исследование и других белков мышц — альбуминов и белков нерастворимого остатка (сарколеммы).

Кроме того, мы считали желательным исследовать отдельно специфический для мускульной ткани рыб белок-миопротейд, который по условиям своей растворимости относится к белкам, переходящим в водную вытяжку, но по условиям осаждения из раствора не может быть отнесен к альбуминам, так как он не свертывается при кипячении.

Таким образом нами были намечены для выделения и изучения следующие фракции белков:

- 1) альбумины — растворимые в воде белки;
- 2) миозины — белки типа глобулинов, растворимые в растворах средних солей, в разведенных растворах слабых кислот и пр.;
- 3) миостромины — растворимые в слабых растворах щелочей;

4) сарколемма ядра и пр. — белки остатка мускульной ткани после извлечения из нее белков других (вышеуказанных) групп;

5) миопротеид — в порядке желательного дополнения к основной схеме.

Прежде чем приступить к выделению белковых фракций из мышц судака, нами была проведена методическая работа для установления растворителей, их концентраций и условий осаждения белков из полученных растворов.

Для того чтобы установить, сколько раз нужно обрабатывать водой мускульную массу рыб для полного извлечения воднорастворимых белков, и чтобы иметь представление о количестве белков, переходящих в ту или другую водную фракцию, мы определили весовым путем количество свернутых, промытых спиртом и эфиром и высушенных до постоянного веса белков, извлеченных из 100 см³ водной вытяжки, соответствующей 10 г мускульной массы. Результат получился такой:

1-е извлечение	водой	— 0,27 г	белков
2-е	”	— 0,05	”
3-е	”	— 0,01	”
4-е	”	— 0,0001	”

Таким образом в первую фракцию перешло около 80%, во вторую — около 15% и в третью около 3% общего количества растворимых в воде белков.

Чтобы определить количественное содержание белков, извлекаемых водой, раствором NaCl, слабым раствором щелочи, были взяты шесть навесок рыбного фарша около 1 г каждая и обработаны: две из них — водой, две — 7%-ным раствором NaCl и две — 0,05%-ным раствором NaOH. Обработку проводили многократно до полного извлечения белков каждым из растворителей. Затем определяли азот по Кьельдалю в аликвотной части фильтрата и в остатке после извлечения. Кроме того, в отдельных навесках были сделаны определения общего азота и белкового азота по Барнштейну. В результате были получены следующие данные, выраженные в процентах содержания азота в сыром мясе (данные из двух определений):

Таблица 1

Общий азот	Белковый азот	Азот воднорастворимых белков		Азот, растворимый в 7% NaCl		Азот, растворимый в 0,05%-ном NaOH	
		фильтрата	остаток	фильтрата	остаток	фильтрата	остаток
2,98	2,71	0,86	2,18	2,19	0,85	2,57	0,46

Эти цифры дают нам возможность вычислить количественное содержание белков в четырех фракциях белков, а именно:

вычитая экстрактивные вещества из водно-растворимых белков, получаем альбумины — 0,59; вычитая из солевой фракции водно-растворимую, получаем миозины — 1,33; вычитая из щелочных фракций солевую, получаем миостромины — 0,38 и, наконец, остаток после щелочного извлечения дает количество ядерных нуклеинов и пр. — 0,46%.

При исследовании миопротеида мы исходили из данных анализа отдельных навесок фарша. Навеска фарша (200—400 г) обрабатывалась двойным количеством воды в продолжение нескольких часов при помешивании, причем жидкость процеживали через марлю, слабо подкисляли уксусной кислотой, нагревали (20—30 мин.) на кипящей водяной бане и отфильтровывали от свернувшихся белков; прозрачный фильтрат кипятили несколько минут, профильтровывали в случае появления хлопьев и лишь после этого осаждали миопротеид подкислением уксусной кисло-

той (при концентрации около 0,1% из горячего фильтрата). Очищение миопротейда производилось подкислением уксусной кислотой и пересаживанием его в слабом аммиаке, после чего осадок тщательно промывался горячей водой. Полученный таким образом миопротейд в форме белого влажного осадка служил нам для предварительного испытания некоторых его свойств.

Уже из вышеизложенного можно видеть, что миопротейд является белком с ясно выраженными кислыми свойствами, не коагулирующим при нагревании и кипячении в щелочных, нейтральных и даже в слабо-кислых растворах. Он выпадает только при достаточном подкислении раствора, полное — из нагретой жидкости и не теряет своей способности растворяться в слабом растворе аммиака. Испытание на отношение миопротейда к раствору уксусно-кислого натра обнаружило очень незначительную растворимость в нем миопротейда.

Для определения количественного содержания миопротейда в мышечной ткани навески фарша (по 25 г) обрабатывались водой до полного извлечения растворимых белков. Полученную вытяжку освобождали от коагулирующих при кипячении белков, после чего из нее осаждали миопротейд таким же способом, как было указано выше. После однократного пересаживания (из слабо-аммиачного раствора) миопротейд собирали на взвешенный фильтр, промывали горячей водой, спиртом и эфиром и высушивали до постоянного веса. Таким путем было найдено, что количественное содержание миопротейда в мышцах судака составляет около 1%.

После того как ход анализа выделения белковых фракций был проверен на пробных образцах, мы начали работу по выделению белковых фракций в количествах, необходимых для их гидролиза и исследования химического состава. С этой целью с парного судака весом 4 600 г сняли кожу вместе с чешуей, удалили голову, плавники, внутренности и кости. Мышцы три раза пропустили через мясорубку. Фарш был взят для удобства обработки отдельными навесками по 200 г в количестве 1 кг. Навески были залиты десятикратным количеством воды, хорошо перемешаны при помощи стеклянной палочки и оставлены на ночь при температуре 2—3°.

Для предохранения от порчи пробы консервировали тимолом. Во избежание перехода глобулинов в водную вытяжку, что могло бы произойти при небольших объемах растворителя за счет солей, имеющихся в мускулах рыбы, употребляли десятикратный объем воды.

На другой день жидкость осторожно сливали с навесок, и так как за ночь осадок хорошо осел, а жидкость над ним лишь слабо опалесцировала, мы ограничились фильтрованием через сложенную в несколько раз марлю. Фильтраты от навесок соединяли вместе, а навески снова заливали таким же количеством воды. Извлечение белков продолжали до тех пор, пока фильтрат при подкислении 1%-ной уксусной кислотой и нагревании с добавлением NaCl не давал больше осадка, а пробы Геллера и биуретова не были отрицательны. Нам пришлось шесть раз обрабатывать навески водой, чтобы добиться полного извлечения водно-растворимых белков.

Для получения белковых препаратов были взяты только первое и второе водное извлечения, так как последующие извлечения содержали незначительные количества белка, а большие объемы жидкости значительно усложнили бы весь ход работ. При выделении белков из профильтрованной через марлю вытяжки в нее прибавили хлористый натр с тем, чтобы концентрация его в растворе равнялась 1%, и уксусную кислоту до концентрации 0,05%. После этого раствор нагревали в литровых стаканах на водяной бане, затем на сетке до кипения. Выделялся хлопьевидный осадок водно-растворимых белков, быстро оседавший на дно. Жидкость с осадка сливали сифоном, а осадок переносили

на фильтр, на котором промывали его горячей водой для удаления хлоридов (проба с AgNO_3).

Отмытый водой осадок обрабатывали кипящим алкоголем, затем эфиром в аппарате Сокслета. Полученный таким образом высушенный и растертый в ступке препарат водно-растворимых белков просеивали через тонкое сито для удаления волокон фильтровальной бумаги, после чего он имел вид тонкого порошка, слегка окрашенного в желтый цвет.

Остаток мускульной массы после извлечения его водой обрабатывали 7%-ным раствором хлористого натрия. Эта концентрация была установлена серией опытов с более низкими (2,5—5% NaCl) и с более высокими (10% NaCl) концентрациями. Максимальное извлечение белков наблюдалось при концентрациях 5—10%.

Согласно работе Логана (11), который проверял влияние различных концентраций растворов на количество выделяемого белка из мускулов пикши, наибольшее количество белка извлекается при содержании 6,8—7,8% NaCl .

На основании наших исследований, результаты которых совпадают с литературными данными, мы и остановились на содержании 7% NaCl .

Кроме растворов хлористого натрия, мы испытывали в качестве растворителя белков смесь фосфатных солей: 18 г однозамещенного фосфорнокислого калия и 46 г двузамещенного фосфорнокислого калия на 1 л воды.

Этот раствор был нейтрален на лакмус. К сожалению, опыты извлечения белков фосфатными солями не пришлось окончить из-за отсутствия достаточного количества двузамещенного фосфорнокислого калия.

Нами был проведен также опыт извлечения группы миозинов слабым раствором уксусной кислоты. При этом получались растворы, крайне трудно фильтрующиеся вследствие набухания остатка (миостромы); поэтому мы при выделении препаратов остановились на методике извлечения глобулинов раствором хлористого натра. Это казалось нам целесообразным еще и потому, что таким образом мы могли создать условия, приближающиеся к условиям перехода в раствор белков мяса при посоле рыбы.

Извлечение белков солевыми растворами вели так же, как и водой, оставляя навески с растворами, после тщательного перемешивания, на ночь. Затем раствор сливали, наливали новую порцию растворителя до тех пор, пока фильтрат перестал давать реакцию на белок. В нашем опыте белки извлекали солевым раствором шесть раз.

Для выделения белков было взято только первое извлечение, так как последующие фильтраты содержали небольшие количества белков. Раствор подкисляли уксусной кислотой, причем определяли предварительными опытами количество ее, при котором выпадает максимальное количество хлопьев, затем раствор нагревали до 70°. В результате выпадал быстро оседающий хлопьевидный осадок. Его отфильтровывали и вели обработку спиртом и эфиром так же, как и в воднорастворимой фракции. Получали сероватого цвета препарат белков, растворимых в солевых растворах.

Выделение белков из солевых растворов мы пробовали вести и другими способами: 1) десятикратным разбавлением водой и 2) пропусканием тока CO_2 с разбавлением (1:1) водой. При первом способе появлялась только сильная муть, при втором образовывался хлопьевидный осадок.

Мы предпочли пользоваться подкислением раствора уксусной кислотой, ибо эта методика в наших условиях была наиболее удобной.

Остаток мускульной массы после извлечения солевыми растворами обрабатывали 0,05%-ным NaOH , предварительно хорошо отмыв его от NaCl . В щелочи настаивали остаток два часа, причем осадок сильно разбухал и принимал вид желтоватой стекловидной массы.

Через два часа жидкость осторожно сливали, а затем два раза извлекали мускульную массу водой, оставляя на ночь. Такую обработку щелочью, чередуя с настаиванием водой, мы проделывали пять раз, чтобы извлечь все белки, растворимые в щелочах. Полученный фильтрат подкисляли уксусной кислотой и слегка нагревали, при этом выпадал осадок, который мы переносили на фильтр и обрабатывали спиртом и эфиром, как первую и вторую фракции. Остаток мускульной массы отмывали от щелочи, кипятили со спиртом, затем обрабатывали эфиром в аппарате Сокслета.

Таким образом были получены следующие препараты белков из мышц судака:

- 1) водно-растворимые белки — альбумины,
- 2) растворимые в солевых растворах — миозины,
- 3) растворимые в слабых щелочах — миостромины,
- 4) остаток — белки сарколеммы, ядер и пр.

Получить препарат миопротеида за недостатком материала нам, к сожалению, не удалось.

Определение физико-химических свойств белковых фракций в нашей работе имело ориентировочное значение и служило отчасти подсобным материалом при методической и препаративной работе по выделению белковых фракций.

Нами были определены оптимум осаждения, границы высаливания сернокислым аммонием и хлористым натром и температура свертывания фракций белков, растворимых в воде (альбуминов) и в солевых растворах (глобулинов или миозинов). Эти данные нами здесь и приводятся:

I. Альбумины

Оптимум осаждения (pH) — 5,1—5,4
Границы высаливания

При помощи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:
Нижняя — 2,0—2,2
Верхняя — 6,0

При помощи NaCl:
8,0 (соответствует около 20% NaCl)
Нет (полностью не высаливается даже при насыщении)

Температура свертывания

В отсутствии соли:
Помутнение — 40,5
Хлопьеобразование — 51°

В присутствии 5% NaCl:
37-38°
43°

II. Глобулины

Оптимум осаждения — 4,4

Границы высаливания

При помощи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:
Нижняя — 0,6
Верхняя — 2,0—2,4

(из раствора в 3%-ном NaCl)
При помощи NaCl:
7,0 (соответствует 17—19% NaCl)
Нет (полностью высаливается)

Температура свертывания (из раствора NaCl около 6%, без подкисления).

Помутнение — 37—42°
Хлопьеобразование — 88°

Для миостроминов, характеризующихся тем, что они нерастворимы в нейтральных растворителях, оптимум осаждения (pH) не определялся.

Определение температуры свертывания нагреванием щелочного раствора (0,05% NaOH) показало, что при этом не только не происходит свертывания (помутнения или образования хлопьев), но наблюдается даже усиление прозрачности (при нагревании до 50—70°) опалесцирующего раствора.

Распределение азота, серы, фосфора и железа в белках мышечной ткани судака.

Белки	Содержание в абсолютно сухом веществе (в %)					Содержание азота в абсолютно сухом веществе (в %)										От общего азота (в %)						
	с е р а	ф о с ф о р	ж е л е з о	общего гидролизата					аминного азота					аминного азота								
				азидного азота	метаннинов	оснований	остатка моноаминокислот	оснований	оснований	моноамино-	кислот	аргинина	гистидина	лизина	азидного азота	метаннинов	оснований	фильтрат от оснований	оснований	кислот	аргинина	гистидина
Альбумины (воднорастворимые)	0,514	0,100	0,021	15,280	975,0	227,4	0,29	10,31	2,74	10,17	1,715	0,01	2,31	6,38	1,49	26,36	67,29	17,92	66,58	11,23	0,07	15,08
Миозины (растворимые в солевых растворах)	0,343	0,086	0,634	15,611	1,020	0,170	4,520	10,12	2,87	10,14	2,01	0,21	2,30	6,55	1,11	28,97	64,83	18,38	64,97	12,88	1,32	14,76
Миостромины (растворимые в слабых кислотах)	0,277	0,111	0,018	15,761	1,800	0,140	4,34	10,11	2,77	10,19	2,00	0,11	2,23	7,48	0,88	27,55	64,15	17,58	64,69	12,72	0,63	14,15
Белки сарколеммы, ядер и пр. (остаток после извлечения растворами)	0,710	0,180	0,017	15,981	2,030	0,192	4,64	10,58	2,68	10,30	2,38	0,259	2,01	7,53	1,19	29,02	66,21	16,77	64,75	14,91	1,60	12,56

Границы высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из такого же раствора:

Нижняя — около 1

Верхняя — 2-3

Для 4-й фракции белков — остатка, полученного после последовательной обработки мышечной ткани водой, раствором NaCl и слабой щелочью (сарколемма, ядра и пр.), — физико-химические свойства не определялись.

Для миопроотеида, выделенного при методической работе из пробного образца судака, нами определены:

оптимум осаждения (рН) — 4,1 и ориентировочно границы высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

нижняя — 1 — 2

верхняя — около 4.

Примечание. Цифры, характеризующие границы высаливания, указывают количество см^3 насыщенного раствора соли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ или NaCl на общий объем жидкости (раствор белка + раствор соли + вода), равный 10 см^3 .

Полученные препараты белка были подвергнуты гидролизу с 20 %-ным HCl, и в гидролизатах определено содержание форм азота по схеме ван-Слайка (методика Плиммера). Кроме того, было определено количество фосфора, серы и железа.

Ход гидролиза и методика исследования описаны в работе по изучению икры осетровых, проведенной в 1935 г. (К. Белинская, П. Карпов, О. Шапиро, „Изучение химического состава белков икры осетровых,“ — „Труды ВНИРО“, т. VI, Москва, 1937).

Результаты приведены ниже в таблице 2.

Из приведенных цифр мы видим, что по количеству азота и по распределению его по группам по схеме ван-Слайка фракции сравнительно мало отличаются друг от друга.

Количества фосфора, серы и железа различны в каждой фракции; миозины отличаются от остальных трех фракций значительным содержанием железа и малым количеством фосфора; белки сарколеммы содержат наибольшее количество серы и фосфора.

Таким образом выделенные из мышечной ткани судака фракции белков различны как по химическому составу, так и по физико-химическим свойствам (температура свертывания, оптимум осаждения и границы высаливания).

ЛИТЕРАТУРА

1. Я. Э. Гесснер — Распределение азота в миозине и миостромине. 1916. (Диссертация)
2. М. Д. Ильин — Организованные белки мышечного волокна (миозины и миостромины), СПб., 1900 г. (Диссертация).
3. М. Д. Ильин — К характеристике белков рыбьего мяса. Материалы ВНИИРП, вып. 4, 1935.
4. Д. И. Кураев — О белковом состоянии мышц спокойных и деятельных (Диссертация). СПб., 1896.
5. Л. Л. Прухницкий — К характеристике белков рыбьего мяса. 1912. (Диссертация).
6. Н. Умиков — Физиология белкового запаса в животном организме. Физиологический сборник, т. II, 1891.
7. Ярославцев — Специфические белки мышечной ткани. Физиологический журнал им. Сеченова, XIX, вып. 4, 1935.
8. A. J. Danilewskii — Myosin, seine Darstellung, Eigenschaften Umwandlung im Synthesis und Rückbildung aus demselben. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie, B. V, 1881.
9. O. Fürth — Ueber die Eiweisskörper des Muskelplasmas. Archiv f. experim. Path. u. Physiol. Bd. 26, 1895.
10. M. I. Galwialo und C. I. Kreines — Verteilung des Stickstoffs, Phosph. Eisens u. Schwef. in Miosin u. Miostram. Biochemin. Z. B. 222, 1930.
11. I. F. Logan — The soluble proteins of the muscle tissues of the haddock. Contributions to Canadian Biology and Fisheries. N. S. V. VI, N. 1, 1930.
12. Hans H. Weber — Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweisskörper. Biochem. Ztschr. Bd 158, H. 1—3, 1925.
13. — Wladimirow — Verteilung des Eiweissstickstoffs in Muskelgewebe. Biochem. Ztschr., Bd. 167, H. 1—3, 1926.
14. Wladimirow — Beiträge zur kolloidchem. Charakteristik der Miosin u. Miostram des Herzen, Biochem. Ztschr., B. 222, 1930.

SUMMARY

Four fractions of protein have been isolated from the muscle tissue of the *Lucioperca lucioperca*: 1. albumins — water soluble, 2. myosins — soluble in brine solutions, 3. myostromins — soluble in weak alkaline solutions, 4. the protein of sarcolemma nuclei, etc — the residue after isolating by solutions.

Fractions of protein have been hydrolyzed by a twenty per cent hydrochloric acid, the contents of nitrogen of the amino — acid groups in the hydrolytic solutions was determined by the Van-Slyke method. Besides the contents of sulphur, phosphorus and iron have been determined. The temperature of coagulation, the optimum precipitation and the limits of salt precipitation have been determined.
