

УДК 664.951.002.5

**САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ И МИОФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ
СВЕЖЕЙ РЫБЫ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ**

Н. Д. Бобровская, Л. Р. Копыленко

Применение радиационного метода консервирования пищевых продуктов вызывает необходимость проведения биохимических исследований с целью изучения процессов, возникающих при облучении продукта и последующем его хранении. Из литературы известно, что ионизирующая радиация действует прежде всего на белки, жиры и витамины [4, 5, 10, 12]. Вопросы, связанные с изменением этих соединений у рыб после облучения и при хранении, в литературе почти не освещены.

В наших исследованиях основное внимание было уделено белкам. Показателем биохимических изменений белков служила растворимость — одна из основных констант их нативности и гомогенности, отражающая денатурационные изменения. Саркоплазматические белки и белки актомиозинового комплекса наиболее чувствительны к действию радиации. Первая группа во многом определяет органолептические показатели рыбы. Миозин — основной белок мышечной ткани, в значительной мере обуславливает ряд очень важных для технологии свойств: консистенцию, влагоемкость, пластичность, питательную ценность. Поведение белковых растворов в электрическом поле в связи с тем или иным воздействием — один из показателей структурных изменений белков.

В качестве объектов для исследования были выбраны различные виды морских и речных рыб: треска, мерлуза, путассу, ледяная рыба, окунь, лещ чилийский (тощий) и нототения, клыкач, карп (жирный). Для опыта из трала брали рыб одного пола. Удаляли у них головы, внутренности, промывали, просушивали между листами фильтровальной бумаги, укладывали в пакеты из пленки ПЦ-2, которые вакуумировали на установке «Негро». Рыбу облучали на корабельной гамма-установке «Ставрида» (C^{137}) и на гамма-установке ВНИИРТа (Co^{60}) дозами 0,2; 0,4 Мрад, признанными нами оптимальными, и дозами 1,5 и 2,5 Мрад, заведомо завышенными, но используемыми для выявления тенденции к сдвигу определяемых показателей. Опытный материал хранили при температуре 2—5°С и анализировали через 1, 15, 30 и 60 суток после облучения.

Наряду с изучением растворимости мышечных белков морских рыб проводилось электрофоретическое разделение саркоплазматических белков речных рыб. Саркоплазматические белки экстрагировали фосфатным буфером, с рН 7,4, ионной силой 0,1; миофибриллярные — раствором Вебера и 0,6 М раствором хлористого калия с АТФ [2]. О содержании белков во фракциях судили по количеству азота, определяемому по микрокельдалю и Несслеру.

Электрофорез белков проводили на хроматографической бумаге марки Б в веронал-мединаловом буфере с рН 8,6 и ионной силой 0,1 при напряжении 300 В, силе тока 10 мА.

Скорость перевариваемости белков мышц определяли после действия пепсина. 20 г мышц мяса путассу (контрольные и облученные дозами 0,4 и 2,5 Мрад образцы) растирали в ступке с кварцевым песком, помещали в колбы, заливали 120 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты (рН 1,8—2) и помещали в термостат при температуре 38°С. Одновременно в термостат ставили колбу со свежеприготовленным раствором пепсина. После выравнивания температуры растворы сливали вместе. Соотношение пепсина и мышц — 1 мг : 1 г. Пробы в количестве 20 мл отбирали до внесения пепсина и после внесения его через 20, 40, 60, 80 и 100 мин. Каждую пробу осаждали 20%-ным раствором трихлоруксусной кислоты так, чтобы конечная концентрация ее в растворе была 5%. Затем инактивировали нагреванием в течение 5 мин на кипящей водяной бане. После инактивации ставили в холодильник; через 12 ч брали фильтрат для определения небелкового азота.

В табл. 1 приведены результаты исследований растворимости мышечных белков у облученных морских и речных рыб в процессе хранения, из которых следует, что облучение жирных и тощих рыб дозами 0,2 и 0,4 Мрад не изменяет растворимости саркоплазматических и мио-

Таблица 1

Растворимость мышечных белков облученных рыб в процессе хранения

Доза, Мрад	Саркоплазматические белки				Миофибриллярные белки			
	сутки хранения				сутки хранения			
	0	15	30	60	0	15	30	60

Нототения — *Notothenia Rossi marmorata* (в мг/г)

0	12	8,4	—	—	20,3	8,5	—	—
0,2	11,2	9,6	9,6	—	16,7	14,5	15,0	—
0,4	10,8	9,4	9,2	—	16,3	16,0	16,0	—

Путассу — *Micromesistius australis* (в мг/г)

0	9,9	9,0	—	—	15,6	8,6	—	—
0,2	9,2	7,9	7,0	—	13,3	13,1	10,9	—
0,4	8,7	7,8	7,7	—	13,3	13,3	12,3	—

Ледяная рыба — *Chaencephalus aceradus* (в мг/г)

0	9,0	7,0	—	—	6,5	3,0	—	—
0,2	9,0	7,0	7,8	7,8	6,5	6,2	6,1	2,0
0,4	9,0	7,0	7,8	7,8	6,5	6,2	6,3	4,0

Мерлуза — *Merluccius hubsi* (в мг/г)

0	6,6	6,2	—	—	4,5	4,0	—	—
0,2	6,6	9,0	9,0	7,0	4,0	5,4	4,0	3,0
0,4	6,6	9,0	9,0	7,0	4,0	5,2	5,2	4,0

Клыкч — *Dissostichus eleginoides* (в мг/г)

0	7,6	5,9	—	—	6,3	3,4	—	—
0,2	7,6	7,2	6,0	5,0	6,1	5,6	5,2	5,0
0,4	7,6	7,3	6,0	5,1	6,0	5,6	5,2	5,1

Морской лещ — *Brama brama* (в мг/г)

0	7,4	6,5	—	—	6,1	2,1	—	—
0,2	7,4	7,0	6,5	5,4	6,0	5,1	4,2	4,0
0,4	7,4	7,2	6,5	5,6	6,0	5,2	4,2	4,0

Речной карп — *Cyprinus carpio* (в % к азоту белка)

0	27,5	25,8	—	—	55	—	—	—
0,2	28,0	24,3	21,4	—	52	50,6	47,6	—
0,4	26,5	22,7	20,4	19,6	51,5	48,4	44,0	43,3

фибриллярных белков. Однако это не характерно для рыб (нототении и путассу), находящихся на последней стадии зрелости гонад — перед икротетанием. В этом случае исследуемые дозы вызывают значительное снижение растворимости саркоплазматических и особенно миофибриллярных белков сразу после облучения и при дальнейшем хранении. По-видимому, в момент икротетания защитные свойства организма рыб снижаются и мышечные белки становятся менее стойкими к воздействию гамма-лучей.

В процессе хранения (на 15-е сутки) ледяной рыбы, мерлузы, клыкача и морского леща растворимость миофибриллярных белков снижается незначительно, саркоплазматические белки остаются на первоначальном уровне. Через 30 и 60 суток тенденция к снижению растворимости миофибриллярных белков сохраняется у всех исследуемых рыб, за исключением клыкача и морского леща. Количество саркоплазматических белков в эти сроки снижается и только у ледяной рыбы остается на том же уровне, как при 15-дневном хранении.

При электрофоретическом разделении саркоплазматических белков карпа свежего, мороженого и облученного дозами 0,2; 0,4 и 1,5 Мрад были выявлены четыре четкие фракции (фракции пронумерованы по скорости продвижения от катода к аноду) и согласно литературным данным идентифицированы как миоальбумины, глобулин X, миогены, миоглобулин [1, 7].

После облучения подвижность первых трех фракций белков во всех образцах почти одинакова, за исключением образца, облученного дозой 1,5 Мрад (рис. 1). Подвижность последней фракции белков снижается по мере увеличения дозы; у образцов, облученных дозой 1,5 Мрад, место расположения ее почти совпадает с линией нанесения пробы.

Из данных табл. 2 следует, что содержание фракций саркоплазматических белков (в % к сумме всех фракций) после облучения почти не меняется. В процентном отношении фракций наибольшими являются третья и вторая, затем следуют четвертая и первая.

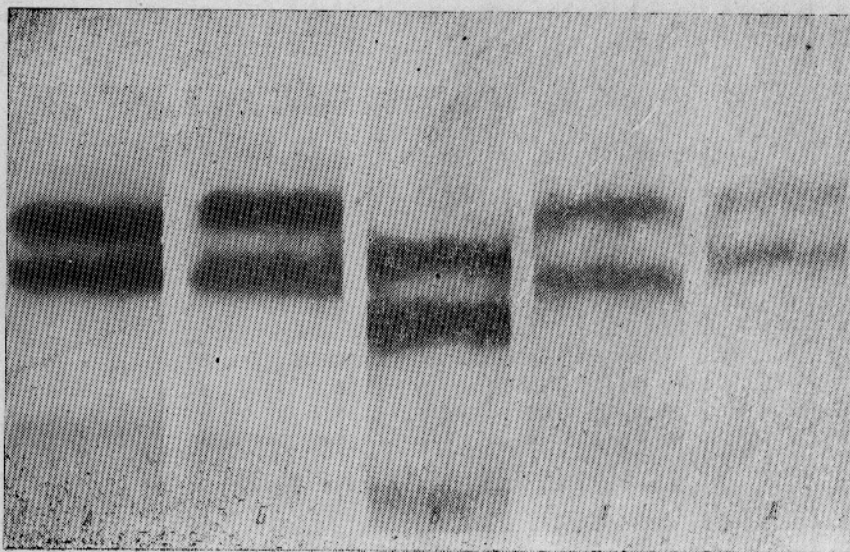


Рис. 1. Электрофореграммы саркоплазматических белков свежего, мороженого и облученного карпа (одни сутки хранения):

А — свежий карп; Б — мороженный; В — облученный дозой 0,2 Мрад;
Г — облученный дозой 0,4 Мрад; Д — облученный дозой 1,5 Мрад.

По мере увеличения дозы облучения подвижность четвертой фракции белков при хранении уменьшается (рис. 2).

Таблица 2

Изменение белковых фракций карпа (в % к сумме всех фракций) в процессе хранения

Исследуемые образцы	Фракции			
	первая	вторая	третья	четвертая
1-е сутки				
Контроль	3,06	39,75	47,79	9,43
Мороженный	2,79	38,27	48,98	11,45
Облученный, Мрад				
0,2	2,44	38,4	48,4	10,6
0,4	2,13	40,8	46,1	10,9
1,5	3,04	40,9	43,6	10,4
15-е сутки				
Мороженный	3,88	40,1	48,4	7,51
Облученный, Мрад				
0,2	4,39	39,74	47,52	7,34
0,4	5,38	41,93	48,65	4,03
1,5	4,34	42,77	42,04	10,73
30-е сутки				
Мороженный	4,81	42,94	46,02	5,65
Облученный, Мрад				
0,2	13,78	41,85	43,85	5,01
0,4	2,92	37,8	39,27	3,71
1,5	3,97	42,88	35,0	3,59
60-е сутки				
Мороженный	3,09	46,3	48,01	4,59
Облученный, Мрад				
0,4	13,7	43,04	44,05	4,39
1,5	6,20	51,65	40,08	2,07

На 15-е сутки хранения относительное количество второй фракции практически не изменяется и составляет 40,1; 39,74 и 41,93% соответственно у мороженных и облученных дозами 0,2 и 0,4 Мрад образцов, в контроле — 39,75%; количество белков третьей фракции составляет 48,4; 47,55 и 48,65%, в контроле — 47,79%. Такая же картина характерна для второй и третьей фракций и на 30-е сутки хранения. В процессе хранения постепенно уменьшалась растворимость четвертой фракции у всех образцов. Через 2 месяца хранения отмечается некоторое перераспределение в соотношении белковых фракций.

Результаты исследований показали, что образцы свежего карпа, облученного дозами 0,2 и 0,4 Мрад, по растворимости фракций белков не отличаются от мороженных. Заметные изменения выявлены в образцах, облученных дозой 1,5 Мрад, особенно на 30-е и 60-е сутки хранения.

Изменения в соотношении белковых фракций в процессе хранения можно объяснить действием денатурационных процессов, которые, по-видимому, связаны с отщеплением от белков лабильных групп. Литературные данные свидетельствуют о том, что облучение дозами от 0,1 до 1,0 Мрад не вызывает значительных денатурационных изменений

[3, 4]. При облучении мяса дозами 1,4 Мрад и выше изменяются физико-химические свойства миогена и глобулина X [6]. Более глубокие изменения (потеря растворимости миогеновой фракции этих белков) обнаруживаются при облучении мяса дозами 5—10 Мрад.

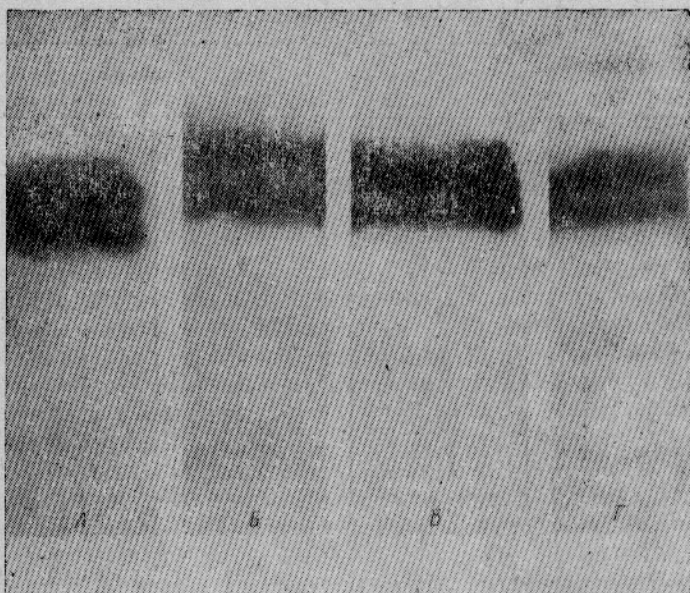


Рис. 2. Электрофореграммы саркоплазматических белков мороженого и облученного карпа (30-е сутки хранения): А — мороженный карп; Б — облученный дозой 0,2 Мрад; В — облученный дозой 0,4 Мрад; Г — облученный дозой 1,5 Мрад

Результаты электрофоретических исследований говяжьего мяса показывают, что электрофореграммы саркоплазматических белков мяса, облученного дозой 1,5 Мрад, не отличаются от электрофореграмм этих же белков охлажденного и мороженого мяса [1].

По-видимому, потери индивидуальных свойств отдельных белков мяса имеют место при облучении дозами выше 1,0—1,5 Мрад. Кроме того, очевидно, в мышечной ткани белки защищены от действия облучения и изменяются меньше, чем чистые растворы белков [9, 10].

Сравнивая результаты электрофоретических исследований белков мяса и рыбы, можно предположить, что белки рыбы менее устойчивы к радиации, чем белки мяса.

Более глубокие изменения структуры белка при его облучении можно обнаружить методом переваривания белков протеолитическими ферментами. Если гамма-лучи производят значительные изменения белковых связей, то эти изменения ведут к более быстрому расщеплению такого белка ферментом. Как известно, причиной повышенной перевари-

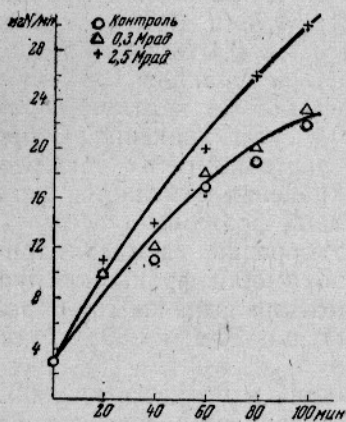


Рис. 3. Скорость расщепления пепсином белков мяса путассу.

заемости после облучения является изменение в структуре белковых молекул, что позволяет ферменту осуществить расщепление пептидных связей при меньшей затрате энергии.

Результаты наших опытов на мышцах путассу, облученных дозами 0,4 и 2,5 Мрад, показывают, что сразу после облучения количество небелкового азота одинаково как в контроле, так и в облученных образцах (рис. 3). После 20 мин переваривания в образцах, облученных дозами 0,4 и 2,5 Мрад, количество азота несколько повышено. В дальнейшем, через 40—100 мин переваривания, направление кривых, характеризующих скорость расщепления белков в контрольном и облученном дозой 0,4 Мрад образцах, совпадает. В образцах, облученных дозой 2,5 Мрад, содержание небелкового азота продолжает резко увеличиваться, что свидетельствует о повышенной скорости ферментативного гидролиза.

Следовательно, доза 0,4 Мрад не вызывает каких-либо значительных изменений в мышечных белках путассу. Увеличение скорости ферментации в первые 20 мин говорит о незначительных нарушениях структурных связей в белках, которые не ведут к потере нативных свойств, так как растворимость и дальнейшая перевариваемость их не отличается от контроля.

Облучение мышц путассу дозой 2,5 Мрад приводит к глубоким изменениям белков, о чем свидетельствует повышенная скорость ферментативного гидролиза.

ВЫВОДЫ

1. Облучение морских и речных рыб дозами 0,2 и 0,4 Мрад не вызывает значительных изменений растворимости мышечных белков; в процессе хранения уменьшается растворимость саркоплазматических и миофибриллярных белков.

2. Методом электрофореза в веронал-мединаловом буфере показано, что саркоплазматические белки образцов свежего карпа, облученные дозами 0,2 и 0,4 Мрад, разделяются на четыре четкие фракции, относительное содержание и электрофоретическая подвижность которых значительно отличаются от белков свежего и мороженого карпа.

3. Перевариваемость пепсином белков мяса рыбы не изменяется при облучении оптимальными дозами 0,2 и 0,4 Мрад.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василевский С. Электрофоретические исследования изменений саркоплазматических белков свиного мяса при разных условиях его хранения. Автореферат дисс. на соискание ученой степени канд. техн. наук. М., 1960, 129 с.

2. Иванов И. И. Биохимия и патобиохимия мышц. Л., 1961, 451 с.

3. Некоторые биохимические изменения свежей рыбы под действием гамма-облучения. — «Труды ВНИРО», 1970, т. XXVIII, с. 51—54. Авт.: А. В. Кардашев, Н. Д. Бобровская, Л. Б. Кляшторин, Н. В. Масленникова.

4. Жузин А. Г. Радиационная биохимия. М., Изд-во АН СССР, 1962, 334 с.

5. Павловская Т. Е., А. Г. Пасынский. О действии ионизирующих излучений на белковые растворы на воздухе и в вакууме. «Биохимия», 1957, т. 22, вып. 2, с. 54—58.

6. Пальмин В. В. Исследование физико-химических и биохимических изменений мяса в результате лучевой стерилизации (излучения Co^{60}) и последующего хранения. Автореферат дисс. на соискание ученой степени д-ра техн. наук. М., 1964, 508 с.

7. Хеннан Р. С. Научные и технологические проблемы применения ионизирующих излучений для консервирования продуктов. М., Пищепромиздат, 1957, с.

8. Alexander P. et al. Direct and indirect effects of ionizing radiations on proteins. Nature, 1956, vol. 178, No. 4538, p. 214.

9. Glew G., Hanson P. I. Some effects of ionizing radiation on aqueous solutions of betalactoglobulin. IV. Preliminary observations on structure changes. U.K.A.E.A. Research Group Reports, 1962, p. 1—27.

SARCOPLASMIC AND MYOFIBRILLAR PROTEINS OF GAMMA-IRRADIATED FRESH FISH

N. D. Bobrovskaya, L. R. Kopylenko

SUMMARY

Data on biochemical studies of sarcoplasmic and myofibrillar proteins of marine and freshwater fishes irradiated with doses of 0,2, 0,4, 1,5 and 2,5 Mrad are presented.

It is shown that irradiation of fish at the dose levels of 0,2 and 0,4 Mrad does not cause any significant changes in the extractability of muscle proteins.

Electrophoresis has revealed that sarcoplasmic proteins of fresh and frozen samples are divided into four distinct fractions, their relative content and electrophoretic motility differing insignificantly from the proteins of carp irradiated with doses of 0,2 and 0,4 Mrad.

PROTÉINES SARCOPLASMATIQUES ET MYOFIBRILLEUSES DE POISSON FRAIS APRÈS GAMMA-IRRADIATION

N. D. Bobrovskaya, L. P. Kopylenko

RÉSUMÉ

On présente les résultats des analyses biochimiques des protéines sarcoplasmiques et myofibrilleuses des poissons de mer et d'eau douce, irradiés par des doses de 0,2; 0,4; 1,5 et 2,5 Mrad.

Il est montré que l'irradiation des poissons par des doses de 0,2 et 0,4 Mrad ne produit pas des changements significatifs dans la solubilité des protéines musculaires.

On a révélé au moyen de l'électrophorèse que les protéines sarcoplasmiques des échantillons frais et congelés se divisent en quatre fractions nettes dont la teneur relative et la mobilité électrophorétique se différencient d'une façon insignifiante des protéines de la carpe, irradiée par des doses de 0,2 et 0,4 Mrad.