

664.951.014 : 664.951.037.5

О РАСТВОРИМОСТИ И АГРЕГАЦИИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ
ПРИ ХОЛОДИЛЬНОЙ ОБРАБОТКЕ РЫБЫ^{х/}

В.П.Быков

Замораживание и холодильное хранение рыбы существенно влияет на ее качество, поэтому свойства мяса мороженой рыбы могут заметно отличаться от свойств мяса свежей.

В результате холодильной обработки мясо рыбы становится сухим, жестким, волокнистым. Из мяса замороженной и затем дефростированной рыбы легко выделяется мышечный сок. Вкусовые свойства мяса свежей рыбы, естественно, лучше, чем мороженой.

За последние три десятилетия исследованиями особенностей тресковых рыб было доказано, что свойства мяса рыбы, подвергшейся холодильной обработке, ухудшаются вследствие денатурации белков актомиозинового комплекса, представляющих наиболее лабильную белковую фракцию мышц и составляющих 60-80% белков мяса рыбы. Денатурация актомиозина проявляется, в частности, в потере способности растворяться в солевом растворе.

х/ Работа проводилась в мае-декабре 1964 г. в химико-техническом институте рыбного директората в Бергене (Норвегия) под руководством доктора Йенсена (Jens.W. Jensen), которому автор приносит благодарность. Автор благодарит директора института Хена (E. Heen) за предоставление возможности провести это исследование

Во многих работах показано, что увеличение степени жесткости мяса рыбы совпадает с понижением растворимости актомиозина. Однако в некоторых более поздних исследованиях не было найдено соответствия между увеличением степени жесткости мяса и понижением растворимости актомиозина.

В последнее время было установлено, что на растворимость актомиозина влияет не только его денатурация при холодильной обработке рыбы, но и прижизненные физиологические и посмертные механо-химические процессы в мышцах рыбы.

Чтобы проследить за денатурацией актомиозина при замораживании и особенно холодильном хранении рыбы, помимо наблюдения за его растворимостью, стали применять другие методы, например, измерение среднего веса белковых частиц, констант их седиментации и диффузии, а также оптического вращения раствора белков в сочетании с определением содержания SH-групп, актефазной активности актомиозина.

Было замечено, что еще до денатурации актомиозина, выражающейся в потере им растворимости, структура его молекул несколько изменяется, что сопровождается агрегацией молекул, которая, по-видимому, влияет на изменение нативных свойств белка, в частности, на способность удерживать влагу.

Еще в 1958 г. Сигран (Seagran) предполагал, что замораживание вызывает некоторые не уловимые обычными методами изменения в структуре актомиозина без заметного влияния на его растворимость, последующему же холодильному хранению рыбы сопутствуют неизвестные пока изменения, которые приводят к постепенной необратимой агрегации молекул актомиозина.

Японские исследователи (Suzuki, Kanka, Tanaka, 1965), применяя метод ультрацентрифугирования, установили, что, несмотря на неизменность растворимости актомиозина при замораживании рыбы в жидком азоте и последующем холодильном хранении при -20°C в течение 3-5 недель,

константа седиментации актомиозина увеличивается, что указывает на агрегацию актомиозиновых молекул.

Коннелль (Connell, 1960), изучая агрегацию актомиозина, пришел к выводу о том, что она имеет две стадии: 1) изменение в структуре молекул актомиозина, которое не влияет на коэффициент седиментации и 2) собственно агрегация, которая сопровождается соответствующим увеличением коэффициента седиментации.

Из классической биохимии известно (Поглазов, 1965), что миозин, актин и актомиозин обладают высокой агрегационной способностью. Однако при изучении свойств этих белков следует различать способность к агрегации нативного и денатурированного белка. Агрегация денатурированного белка в отличие от нативного — явление чрезвычайно распространенное и многократно изучавшееся (Бреслер, 1966).

Поглазов указывает, что в разведенных растворах миозина степень дисперсности его частиц изменяется в результате способности миозина к агрегации, которая зависит от величины pH среды и ионной силы раствора. Эти показатели изменяются и в мясе рыбы при ее хранении и замораживании и, по-видимому, влияют на агрегацию молекул белков актомиозинового комплекса и изменение свойств мяса рыбы.

Явление агрегации белков актомиозинового комплекса мало изучено и его влияние на изменение свойств мяса рыбы при холодильной обработке недостаточно ясно.

Норвежские исследователи (Heen, Karsti, 1965) указывают, что явление агрегации белков, сопровождающееся уменьшением их способности удерживать влагу и потерей растворимости, недостаточно хорошо изучено. Поскольку агрегация белков при холодильной обработке рыбы представляет интерес для понимания денатурационных превращений белков, было проведено наблюдение за агрегацией белков на всех этапах холодильной обработки с учетом посмертного состояния исходной свежей рыбы. При этом, помимо наблюдения за возможной агрегацией белков, определялась их растворимость.

Для исследования изменения белков - агрегации и растворимости - исходили из следующего. Известно, что в состав мяса рыбы входят три белковые фракции: миофибриллярная, саркоплазматическая и строма.

В состав миофибриллярной фракции входят миозин, актин, комплексный белок актомиозин, тропомиозин, из которых построены миофибриллы; саркоплазматической - до 50 белков-ферментов, участвующих в процессах метаболизма; стромы - главным образом коллаген. Миофибриллярные протеины составляют около 60-80%, саркоплазматические - 20-30%, коллаген - 3-5% и только у акул и скатов его содержание доходит до 10%.

Кроме того, мясо рыбы содержит азотистые экстрактивные вещества. Первые две фракции белков, так же как и азотистые экстрактивные вещества, хорошо растворяются в солевом растворе.

Если мышцы измельчить на гомогенизаторе в солевом растворе ($0,5M\ KCl + 0,03M\ NaHCO_3$, $pH = 7,4$), растворимые фракции белков (миофибриллярная и саркоплазматическая), а также азотистые экстрактивные вещества перейдут в раствор. При этом на количество экстрагированных белков будет оказывать влияние их состояние. Под влиянием денатурации в результате холодильного хранения количество экстрагируемого белка уменьшается.

Если раствор белков подвергнуть центрифугированию, то из него осядет какое-то количество белка. На осаждение белков при центрифугировании влияет размер белковых частиц и продолжительность центрифугирования. Чем крупнее частицы, тем меньшее усилие требуется для осаждения их и тем быстрее они оседают. С увеличением давления при том же времени центрифугирования оседают все более и более мелкие частицы.

Поскольку холодильная обработка рыбы вызывает агрегацию белковых молекул, то сравнивая результаты центрифугирования растворов белков, полученных до и после соответствующей холодильной обработки рыбы, по количеству осаденного белка можно судить об укрупнении частиц при данной холодильной обработке и, следовательно, их агрегации.

Методика определения агрегации была следующей. Из филе отбирали пробы весом 10 г, которые помещали в гомогенизатор ("Waring Blender"), туда же добавляли 350 мл раствора хлористого калия (0,5М KCl + 0,03М NaHCO₃ · PH=7,4). Измельчали пробы в гомогенизаторе в течение 30 сек. при 20 тыс.об./мин. в атмосфере азота по методу Дайера (Dyer, 1950), чтобы предотвратить денатурацию белков при измельчении.

В результате такой обработки белки растворялись и образовывали однородный опалесцирующий раствор. Для отделения нерастворившейся соединительной ткани 250 мл раствора центрифугировали при 2000 об./мин. в течение 10 мин., после чего раствор фильтровали через минеральную вату. Из полученного исходного раствора отбирали две параллельные пробы по 5 мл, в которых определяли по микрокьюльдаю общее содержание растворимых белков. Из остальной части раствора отбирали в центрифужные пробирки восемь проб, по 10 мл каждая. Каждые две пробы центрифугировали при 7000, 12000 и 17000 об./мин. в течение 15 мин., а также при 17000 об./мин. в течение 180 мин.

Из отцентрифугированных при разных условиях и затем отфильтрованных через минеральную вату растворов отбирали по две параллельные пробы, каждая по 5 мл, в которых по микрокьюльдаю определяли содержание белка. Затем подсчитывали количество белка, осажденного при данных условиях центрифугирования. По разности между общим содержанием растворимого белка в исходном растворе и содержанием белка в растворе, подвергнутом центрифугированию, определяли количество осажденного белка и выражали количество осажденного при данных условиях центрифугирования белка в % к общему содержанию растворимого белка в исходном растворе. Помимо определения общего содержания растворимого белка, определяли общее содержание белка (азота) в мясе рыбы, а количество общего растворимого белка выражали в % к общему содержанию белка в мясе рыбы, как это принято многими исследователями.

Поскольку методика определения содержания азота (белка) в мясе рыбы, принятая в Норвегии (Howe, 1943) несколько отличается от принятой в нашей стране, целесообразно дать краткое ее описание.

Из приголовной и прихвостовой части рыбы отбирали по 2 г мяса. Из этих двух определений получали среднее содержание общего азота в мясе данной рыбы. Такая методика взятия проб на общий азот в мясе тощих рыб, к которым относится треска, принята в химико-техническом институте рыбного директората.

Общее содержание растворимого белка многими исследователями принято выражать в % к общему содержанию белка в мясе рыбы.

Для определения содержания азота 2 г мяса или 5 мл раствора помещают в колбу Кьельдаля, куда добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты. Туда же добавляют примерно 1 г (на глаз) катализатора, представляющего собой смесь 90 г Na_2SO_4 , 1,5 г CuSO_4 и 1 г порошкообразного селена. Катализатор позволяет сжигать пробу за 2-3 ч.

После сжигания пробы колбу Кьельдаля охлаждают, содержимое переносят в мерные колбы емкостью 50 мл и дополняют до метки дистиллированной водой. Из мерных колб в аппарат для отгонки азота берут 5 мл испытуемого раствора и 10 мл 30%-ного раствора NaOH . В приемную колбу помещают 5 мл 4%-ного раствора H_3O_4 и 8 капель индикатора (состав индикатора - 100 мл раствора бромкрезолового зеленого концентрацией 0,1% и 20 мл раствора метилрога концентрацией 0,1%).

Отгонка азота с момента закипания раствора длится всего 2 мин. Содержимое приемной колбы титруют 0,01N раствором HCl .

В исходном растворе, содержащем разные белковые фракции, помимо общего содержания растворимого белка, определяли содержание обеих растворимых фракций (саркоплазматической вместе с азотистыми экстрактивными веществами и актомиозина), причем первую определяли химическим путем, а

вторую — по разности между общим содержанием растворимых белков и содержанием саркоплазматической фракции с азотистыми экстрактивными веществами^{х/}.

Саркоплазматическую фракцию с азотистыми экстрактивными веществами определяли следующим образом. Из исходного раствора отбирали две параллельные пробы, по 3 мл каждая, в которые добавляли по 27 мл дистиллированной воды. Затем раствор центрифугировали при 12000 об./мин. в течение 15 мин. для осаждения актомиозина. Из центрифугата отбирали 20 мл раствора для определения в нем содержания азота по микрокельдалю.

За растворимость разных белковых фракций, а также за возможной агрегацией белков в рыбе наблюдали во время ее хранения в свежем виде, а также во время замораживания, холодильного хранения и дефростации.

Для опытов использовали живую фюрдовую треску весом около 2 кг, обескровленную и выпотрошенную. За 15 мин. разделанную рыбу доставляли с рынка в лабораторию, где с нее срезали филе, которое сразу же направляли на исследование.

Всего для опытов было использовано 10 рыб. Данные о содержании белка ($n \times 6,25$) в мясе исследованных рыб представлены в табл. I.

Из таблицы видно, что содержание белка в приголовной части разных экземпляров рыб колеблется от 16,7 до 20,8%, а в прихвостовой части от 16,7 до 20,4%.

В среднем для приголовной части рыб содержание белка было равно 18,6%, а в прихвостовой — 18%. По всем рыбам, включая приголовные и прихвостовые части, среднее содержание белка в мясе составило 18,3%.

Результаты наблюдения за растворимостью белков в исходной свежей рыбе показали, что она сильно колеблется по экземплярам (табл. 2).

х/ При дальнейшем изложении, во всех случаях, где идет речь о саркоплазматической фракции белков, необходимо иметь в виду, что эта белковая фракция содержит азотистые экстрактивные вещества

Таблица 1

Номер образца	Количество белка в мясе рыбы, %		
	в приголовной части	в прихвостовой части	среднее
1	20,8	20,4	20,6
2	19,1	17,7	18,4
3	18,8	18,0	18,4
4	18,7	17,9	18,3
5	17,8	17,5	17,7
6	16,7	16,7	16,7
7	18,4	18,3	18,4
8	17,7	17,7	17,7
9	19,2	—	19,2
10	18,3	17,7	18,0
Среднее	18,6	18,0	18,3

Таблица 2

Номер образца	Дата исследования	Общее содержание растворимых белков в % к общему содержанию белков в мясе рыбы
1	29/IV	74,1
2	20/V	57,6
3	14/VI	39,5
Среднее	—	57,2

Из таблицы видно, что содержание растворимых белков в исследуемых образцах рыб колеблется от 39,5 до 74,1% и составляет в среднем 57,2%. При этом у рыбы, исследованной весной (в апреле-мае), содержание растворимых белков (57,6-74,1%) значительно выше, чем у рыбы, исследованной в июле (39,5%). Снижение содержания растворимых белков в мясе рыбы летом, возможно, связано с более интенсивным чем весной, метаболизмом, вследствие чего рыба, содержащаяся в садках, летом утомляется больше, чем весной. Известно (Ганелина, 1962), что по мере утомления животных растворимость мышечных белков уменьшается.

Изменение белков мяса свежей рыбы

Чтобы определить изменение растворимости белков после наступления посмертного окоченения при хранении свежей рыбы, были проведены три серии опытов.

Первая серия опытов. Шесть рыб сразу после убоя, удаления внутренностей и обезглавливания доставляли в лабораторию. Из них двух сразу направляли на анализ (до наступления посмертного окоченения), а четырех укладывали в полиэтиленовые мешочки и помещали в холодильник с температурой 0, +2°C, причем две трески хранили до наступления полного окоченения, а две — до состояния расслабления, после чего направляли на исследование. Из каждой рыбы вырезали кусочки мяса из спинной части ближе к голове и определяли в них общее содержание растворимых белков. Результаты анализа представлены в табл.3.

Таблица 3

Состояние рыбы	Общее содержание растворимых белков				
	в г на 100г мяса		в % к содержанию белка в мясе рыбы		
	I	II	I	II	среднее
Сразу после убоя	10,6	7,0	57,6	39,5	48,6
Полное окоченение	14,1	9,5	76,5	53,7	65,0
Расслабление после окоченения	12,4	10,4	66,7	58,9	62,8

Из данных таблицы видно, что растворимость белков у рыбы сразу после убоя значительно ниже (39,5-57,6%), чем у рыбы в состоянии окоченения (53,7-76,5%).

Если принять растворимость белков у рыбы сразу после убоя за 100%, то у рыбы в состоянии окоченения она на 34%, а у рыбы в состоянии расслабления на 29% выше.

Таким образом, при хранении свежей рыбы с наступлением окоченения растворимость белков значительно повышается, а при дальнейшем хранении снова несколько снижается.

Вторая серия опытов. На результаты первой серии опытов могли повлиять индивидуальные колебания величин растворимости белков у разных рыб. Учитывая это, для подтверждения выясненной в первой серии опытов закономерности изменения растворимости белков в зависимости от посмертного состояния рыбы была проведена вторая серия опытов.

Пробы отбирали у одного и того же экземпляра трески, сразу после убоя и через каждые сутки хранения при температуре 0, +2°C для определения общего содержания растворимых белков. Опыты проводили в течение пяти суток. Результаты опытов приведены ниже.

Время хранения рыбы, сутки	Общее содержание растворимых белков в г на 100 г мяса
0	10,3
1	10,6
2	11,9
3	11,2
4	10,9
5	10,3
Среднее	10,9

Из этих данных видно, что по мере хранения рыбы количество растворимого белка в ее мясе увеличивается на 15%, а затем снова постепенно уменьшается до первоначальной величины. Таким образом, подтверждаются данные, полученные в первой серии опытов.

Вполне естественно было бы предположить, что изменение растворимости является следствием наступления в рыбе посмертного окоченения. Чтобы доказать это экспериментально, были поставлены специальные опыты.

Третья серия опытов. У трески сразу после убоя срезали с обеих сторон филе, которые упаковывали в полиэтиленовые пакеты и помещали на хранение в холодильник с температурой 0, +2°C. На одном филе наблюдали сокращение его по длине, характеризующее наступление посмертного окочене-

ния, а из другого вырезали кусочки мяса для определения растворимости белков. Результаты проведенных опытов представлены в табл.4.

Таблица 4

Время хранения рыбы, ч.	Сокращение филе по длине, % к перво- начальной длине	Общее содержание растворимых белков, г на 100 г мяса
0	0	11,2
4	0,5	11,7
24	7,5	12,2

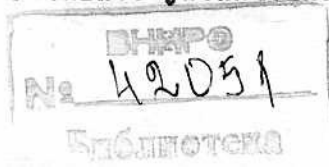
Как видно из таблицы, постепенное наступление посмертного окоченения во время хранения филе сопровождается соответствующим увеличением растворимости актомиозина, что может указывать на взаимосвязь этих двух явлений.

Таким образом, наблюдениями за изменением растворимости белков доказано, что растворимость их в результате наступления посмертного окоченения увеличивается, а при дальнейшем хранении рыбы несколько уменьшается.

Чтобы выяснить роль двух фракций растворимых белков (миофибриллярной и саркоплазматической) в этом изменении растворимости белков, было проведено раздельное определение растворимости этих фракций. Для этого был использован экземпляр трески, который хранился при температуре 0, +2°C и из него отбирали пробы на протяжении 5 суток. Содержание растворимых белков миофибриллярной (актомиозиновой) и саркоплазматической фракций определяли по методике, описанной выше (рис. I).

Как видно из рис. I, растворимость белков при наступлении посмертного окоченения повышается за счет миофибриллярной фракции (белков актомиозинового комплекса), при этом начальное повышение растворимости при наступлении окоченения сопровождается последующим постепенным понижением ее примерно до первоначальной величины.

Что касается саркоплазматической фракции белков, то растворимость ее при наступлении окоченения не изменяется. Последующее незначительное увеличение количества сарко-



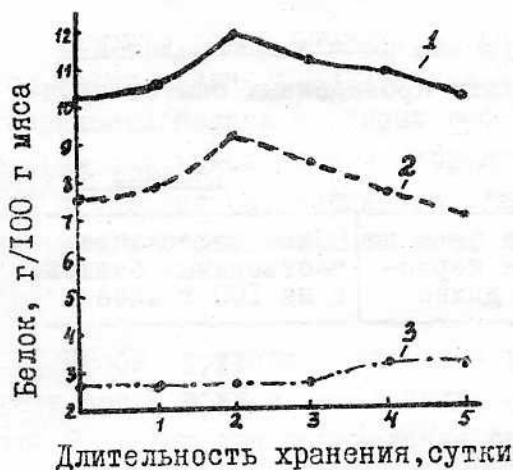


Рис. 1. Изменение растворимости белков мяса рыбы во время хранения ее при температуре 0, +20°C: 1 — общее содержание растворимых белков; 2 — белки актомиозинового комплекса; 3 — белки саркоплазматической фракции с азотистыми экстрактивными веществами.

плазматической фракции следует, по-видимому, отнести за счет азотистых экстрактивных веществ, образующихся в результате автолитических процессов и выделяемых вместе с белками этой фракции.

Таким образом, описанные выше серии опытов на свежей рыбе показали, что при хранении свежей рыбы в результате наступления у нее посмертного окоченения происходит обратимое повышение растворимости белков актомиозинового комплекса. В то же время растворимость саркоплазматической фракции белков практически остается неизменной.

Результаты опытов по центрифугированию растворов белков, полученных из рыбы в разном посмертном состоянии, показаны в табл. 5 и на рис. 2.

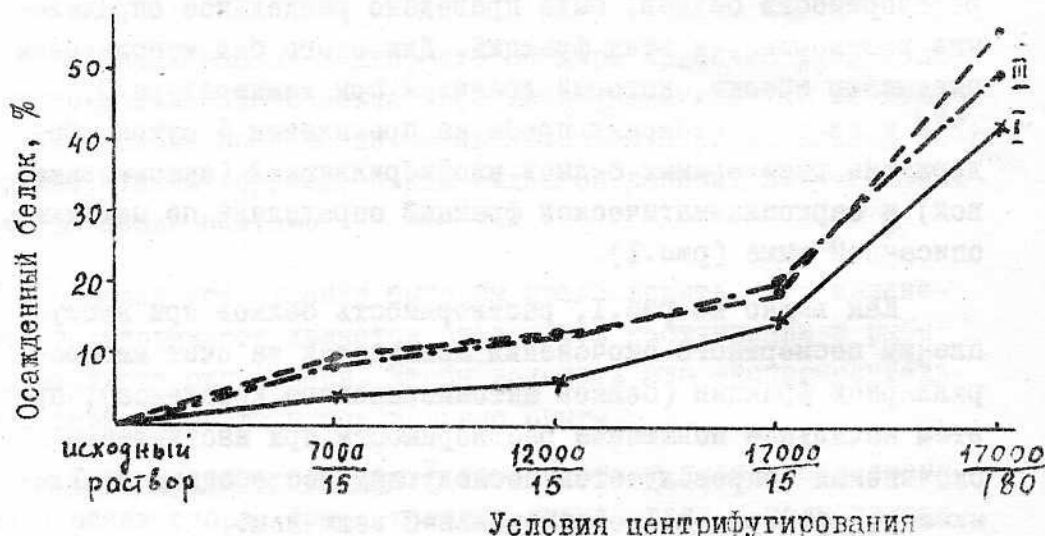


Рис. 2. Осаждение белков из раствора, полученного из свежей рыбы: 1 — рыба до посмертного окоченения; 2 — рыба в состоянии посмертного окоченения; 3 — рыба в состоянии расслабления.

Таблица 5

Б е л о к	Условия центрифугирования				
	Исходный раствор	7000 15	12000 15	17000 15	17000 180
Рыба сразу после убоя					
Растворимый					
г на 100 г мяса	8,8	8,4	8,3	8,0	5,0
Осажденный					
г на 100 г мяса	-	0,4	0,55	1,3	3,8
% к содержанию его в исходном растворе	-	4,5	6,7	15,1	42,5
Рыба в состоянии окоченения					
Растворимый					
г на 100 г мяса	11,8	10,8	10,3	9,7	5,1
Осажденный					
г на 100 г мяса	-	1,01	1,5	2,1	6,7
% к содержанию его в исходном растворе	-	8,95	13,2	18,7	55,9
Рыба в состоянии расслабления после окоченения					
Растворимый					
г на 100 г мяса	11,4	10,4	9,9	9,0	5,0
Осажденный					
г на 100 г мяса	-	1,0	1,5	2,4	6,4
% к содержанию его в исходном растворе	-	8,1	12,5	20,5	50,0

Из данных, приведенных на рис.2, видно, что при любых условиях центрифугирования из белкового раствора, полученного из мяса рыбы сразу после убоя, осаждается меньшее количество белков (4-42,5%), чем из белкового раствора, полученного из рыбы в состоянии окоченения (8,9-55,9%) и расслабления (8,1-50%).

В то же время количество белка, осажденного из раствора, полученного из мяса рыбы в состоянии окоченения, практически равно количеству белка, осажденного из раствора, полученного из мяса рыбы в состоянии расслабления.

Относительное увеличение количества белка, осаждаемого из раствора, полученного из рыбы в состоянии окоченения, и отсутствие дальнейших изменений в количестве осажденного белка из раствора, полученного из рыбы в состоянии расслабления, может быть объяснено образованием актомиозина из актина и миозина при наступлении посмертного окоченения в рыбе и отсутствием его диссоциации при дальнейшем хранении свежей рыбы.

В итоге всех наблюдений за изменением белков в свежей рыбе, можно заключить, что при хранении ее наблюдается обратимое повышение растворимости белков актомиозинового комплекса при наступлении посмертного окоченения, которое сопровождается увеличением среднего размера частиц растворимых белков мяса рыбы.

Изменение белков мяса рыбы при замораживании

Для исследования изменения белков мяса рыбы при замораживании было проведено две серии опытов.

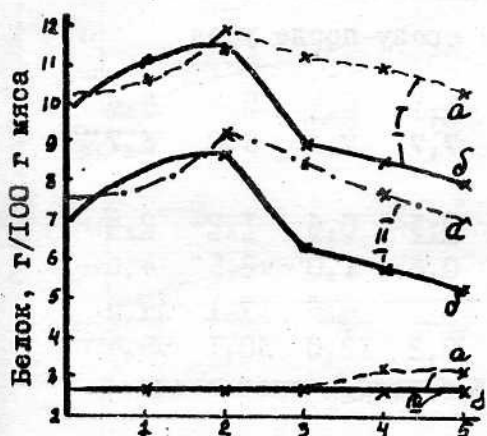
В первой серии опытов наблюдалось изменение растворимости белковых фракций под влиянием замораживания рыбы, находящейся в различных стадиях посмертного состояния, а во второй — за возможной агрегацией белков при холодильной обработке рыбы.

Для проведения первой серии опытов брали треску и срезали с обеих сторон филе. От одного филе отбирали пробу для определения растворимости белковых фракций, а от другого отрезали кусочек мяса, упаковывали в алюминиевую фольгу и помещали в холодильник с температурой -25°C без принудительной циркуляции воздуха для замораживания.

Через сутки из замороженного кусочка мяса отбирали пробу для определения растворимости белковых фракций. Оставшуюся часть обеих половинок филе упаковывали в полиэтиленовые пакеты и помещали на хранение в холодильник с температурой $0 - +2^{\circ}\text{C}$. Через каждые сутки хранения от одной половинки филе отбирали пробы для определения растворимости

белковых фракций, а от другой — отрезали кусочки филе, замораживали их, а затем направляли на исследование.

Такие опыты повторяли на протяжении 5 суток. Из рис.3 видно, что при замораживании рыбы, которая хранилась в течение двух суток (от момента убоя рыбы до наступления полного окоченения), растворимость белковых фракций практически не изменялась.



Длительность хранения, сутки

Рис.3. Изменение растворимости белков мяса рыбы в результате ее замораживания (а — свежая рыба, б — замороженная): 1 — общее содержание растворимых белков; 2 — белки актомиозинового комплекса; 3 — белки саркоплазматической фракции.

Однако при замораживании рыбы, хранящейся более двух суток, растворимость белков значительно уменьшается за счет актомиозиновой фракции.

Для наблюдения за возможной агрегацией белков при замораживании рыбы с учетом ее посмертного состояния от трески, хранящейся при температуре 0, +2°C, отбирали пробы сразу после убоя, в состоянии окоченения и в состоянии расслабления.

Из рыбы в каждой стадии посмертного состояния вырезали кусочки мяса, которые упаковывали в алюминиевую фольгу и замораживали в холодильнике, как это описано выше.

Из проб мяса рыбы до замораживания и после замораживания экстрагировали белки, и растворы белков центрифугировали.

Результаты опытов представлены в табл.6 и на рис.4.

Из приведенных данных видно, что при центрифугировании растворов белков, полученных из образцов мяса рыбы, взятых из нее сразу после убоя, значительно больше осаждалось белков у замороженной рыбы, чем у свежей. Так, при центрифугировании раствора, полученного из свежей рыбы, из него выде-

лялось от 4,3 до 34,3% белков, а при центрифугировании раствора, полученного из замороженной рыбы, - от 7,2 до 55,4%.

Таблица 6

Б е л о к	Условия центрифугирования				
	Исходный раствор	<u>7000</u> 15	<u>12000</u> 15	<u>17000</u> 15	<u>17000</u> 180
Рыба сразу после убоа					
Растворимый	<u>7,0</u>	<u>6,7</u>	<u>6,4</u>	<u>5,8</u>	<u>4,6</u>
г на 100 г мяса	8,3	7,7	7,3	5,8	3,7
Осажденный	-	<u>0,3</u>	<u>0,6</u>	<u>1,2</u>	<u>2,4</u>
г на 100 г мяса	-	0,6	1,0	2,5	4,6
% к содержанию в исходном растворе	-	<u>4,3</u>	<u>8,6</u>	<u>17,1</u>	<u>34,3</u>
		7,2	12,0	30,1	55,4
Рыба в состоянии окоченения					
Растворимый	<u>9,5</u>	<u>8,6</u>	<u>8,0</u>	<u>7,0</u>	-
г на 100 г мяса	9,5	9,2	8,6	8,0	-
Осажденный	-	<u>0,9</u>	<u>1,5</u>	<u>2,5</u>	-
г на 100 г мяса	-	0,3	0,9	1,5	-
% к содержанию в исходном растворе	-	<u>2,1</u>	<u>15,8</u>	<u>25,2</u>	-
		3,1	9,4	15,8	-
Рыба в состоянии расслабления после окоченения					
Растворимый	<u>10,4</u>	<u>9,5</u>	<u>8,2</u>	<u>8,0</u>	-
г на 100 г мяса	9,2	8,6	8,0	7,3	-
Осажденный	-	<u>0,5</u>	<u>1,5</u>	<u>2,4</u>	-
г на 100 г мяса	-	0,6	1,2	1,9	-
% к содержанию в исходном растворе	-	<u>8,2</u>	<u>14,4</u>	<u>23,1</u>	-
		6,5	13,3	20,6	-

Примечание. В дробях: числитель - до замораживания;
знаменатель - после.

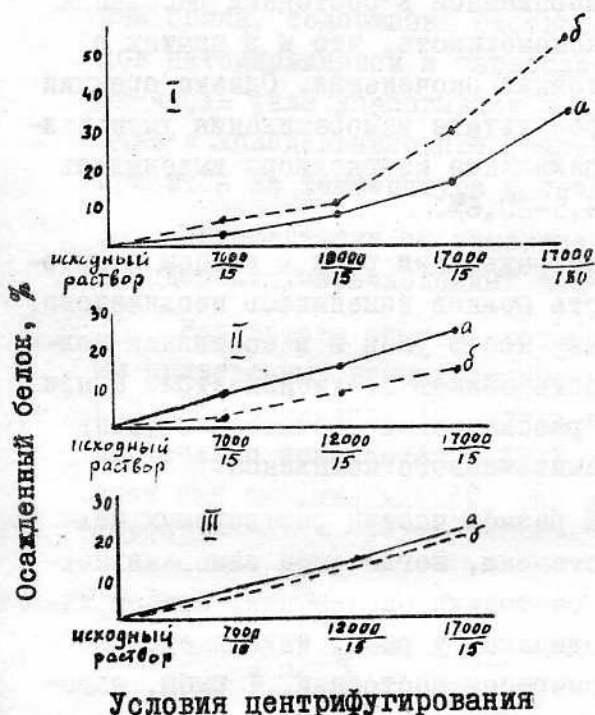


Рис. 4. Осаждение белков из раствора, полученного из свежей (а) и затем замороженной (б) рыбы:

I - рыба сразу после убоя;
II - рыба в состоянии окоченения;
III - рыба в состоянии расслабления.

Эти данные указывают на то, что в растворе, полученном из свежей рыбы, растворенный белок находится в виде менее крупных частиц, чем в растворе, полученном из замороженной рыбы. Различие в размере частиц белков, находящихся в растворах, полученных из рыбы до и после замораживания, может указывать на агрегацию белковых частиц при замораживании.

Однако при проведении опытов на рыбе, замораживаемой в состоянии окоченения, картина была совершенно иной. При центрифугировании растворов белков, полученных из образцов мяса рыбы, осаждение их было большим до замораживания (9,4-25,2%), чем после него (3,1-15,8%).

Это различие в средних размерах частиц белков, находящихся в растворах, полученных из рыбы до и после замораживания, указывает на уменьшение среднего размера частиц, т.е. их дезагрегацию. Уменьшение среднего размера частиц может быть объяснено, например, диссоциацией актомиозина на актин и миозин.

В опытах с рыбой, замороженной в состоянии расслабления, наблюдалась та же закономерность, что и в опытах с рыбой, замороженной в состоянии окоченения. Однако средний размер белковых частиц в результате замораживания уменьшался незначительно: до замораживания из раствора выделялось 8,2-23,1% белка, после - 6,5-20,6%.

Таким образом, при замораживании рыбы в разном посмертном состоянии растворимость белков изменялась неодинаково. При замораживании рыбы сразу после убоя и в состоянии полного окоченения растворимость белков не уменьшается, а при замораживании в состоянии расслабления значительно уменьшается за счет белков актомиозинового комплекса.

В то же время средний размер частиц растворимых белков изменяется в большей степени, когда рыба замораживается сразу после убоя или в состоянии окоченения, причем характер этого изменения неодинаков у рыбы, находящейся до замораживания в разном посмертном состоянии. У рыбы, замораживаемой сразу после убоя, средний размер белковых частиц увеличивается, а у рыбы, замораживаемой в состоянии окоченения и расслабления, - уменьшается, причем во втором случае незначительно.

Изменение растворимых белков мяса рыбы во время ее холодильного хранения

Для исследования изменения белков мяса рыбы при холодильном хранении наблюдали за растворимостью, а также за возможной агрегацией белков. Всего было проведено три серии опытов. В первой серии опытов наблюдали за изменением растворимости белков при холодильном хранении рыбы в зависимости от времени хранения, во второй - за изменением растворимости белков в зависимости от времени хранения и посмертного состояния рыбы до замораживания. В третьей серии исследовали агрегацию белков в зависимости от продолжительности хранения мороженой рыбы.

Первая серия опытов. Для опытов отбирали треску, которую сразу после убоя направляли на исследование. С рыбы срезали филе и замораживали.

От филе отбирали пробы для определения общего содержания белка, содержания растворимых белков, в том числе белков актомиозиновой и саркоплазматической фракции. Оставшуюся часть филе унаживали в алюминиевую фольгу и замораживали в холодильнике при температуре -25°C , а затем хранили при этой же температуре в течение 29 недель.

Периодически от замороженного филе отбирали пробы для определения перечисленных выше показателей.

Результаты опытов представлены в табл.7 и на рис.5. Из приведенных данных видно, что во время хранения мороженой рыбы в течение 10 недель количество растворимых белков постепенно понижается с 15,3 до 7,3 г на 100 г мяса за счет как актомиозиновой, так и саркоплазматической фракций белков.

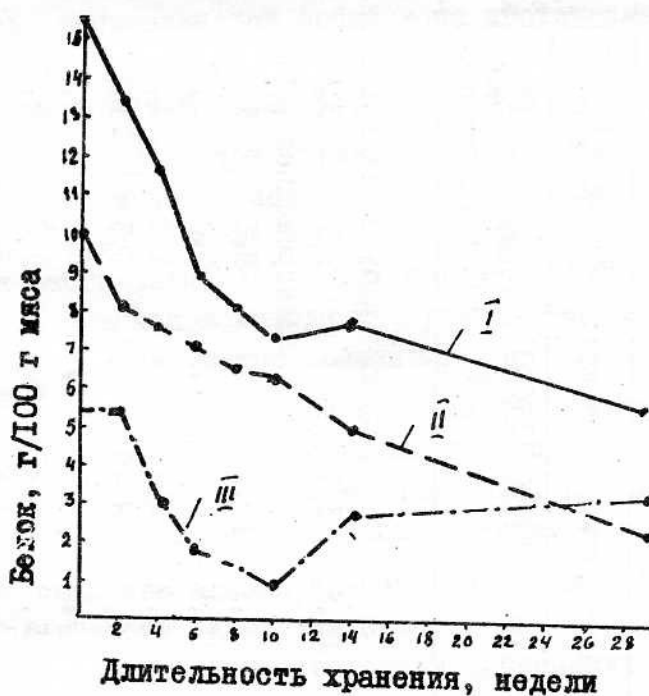


Рис.5. Содержание растворимого белка:
I - общее; II - актомиозиновая фракция;
III - саркоплазматическая фракция.

Так, за 10 дней хранения растворимость актомиозиновой фракции понижается с 9,9 до 6,4 г на 100 г мяса, а саркоплазматической - с 5,4 до 0,9 г на 100 г мяса.

Таблица 7

Время хранения, недели	Содержание белков в растворе										Количество осаждаемых из раствора белков в % к общему содержанию растворимых белков после центрифугирования при	
	исход-ном	после центрифугирования при:				во фракциях, г на 100 г мяса		раство-риных, % к общему				
		7000 15	12000 15	17000 15	17000 180	активно-виновой	сарно-плазма-тической					
0	15,3	14,4	13,5	13,1	8,9	9,9	5,4	82,7	5,8	11,1	14,3	43,1
2	13,5	12,7	12,1	10,7	6,0	8,1	5,4	72,9	5,9	10,4	20,7	46,9
4	11,6	11,3	10,4	8,6	4,9	7,4	3,2	62,7	3,3	9,8	20,5	47,4
6	8,9	8,7	6,7	6,4	4,9	7,1	1,8	48,0	2,3	10,2	28,1	55,1
8	8,0	7,6	6,7	6,4	4,3	6,5	1,5	43,0	5,0	16,2	35,0	56,2
10	7,3	6,4	4,9	4,0	3,7	6,4	0,9	39,4	12,3	32,9	45,2	54,8
14	7,7	6,4	5,5	5,2	4,6	5,0	2,7	41,6	16,8	28,5	32,5	40,2
29	5,6	4,9	4,6	4,6	4,6	2,3	3,3	30,2	12,5	17,9	17,9	17,9

Свежая рыба до замораживания

Замороженная рыба

Однако при дальнейшем хранении рыбы, начиная с 10 до 14 недель, количество растворимых белков увеличивается с 7,3 до 7,7 г на 100 г мяса за счет саркоплазматической фракции, содержание которой возрастает с 0,9 до 2,7 г на 100 г мяса.

При дальнейшем хранении рыбы от 14 до 29 недель растворимость белков мяса рыбы постепенно понижалась с 7,7 до 5,6 г на 100 г мяса только за счет актомиозиновой фракции белков, растворимость которой понижается от 6,4 до 2,3 г на 100 г мяса. В то же время растворимость саркоплазматической фракции постепенно повышалась (с 2,7 до 3,3 г на 100 г мяса).

Таким образом, растворимость мышечных белков при хранении мороженой рыбы постепенно понижается. При этом растворимость актомиозиновой фракции на протяжении всего срока хранения уменьшается, а саркоплазматической — вначале уменьшается, а затем снова увеличивается.

Вторая серия опытов проводилась на трех рыбах, которых направляли на исследование в трех разных посмертных состояниях (сразу после убоя, в состоянии окоченения и в состоянии расслабления) и в них определяли содержание растворимых белков как в исходных образцах (до замораживания), так и после разных сроков хранения.

Результаты исследования представлены в табл. 8, из которой видно, что независимо от посмертного состояния исходной рыбы, направляемой на замораживание, при хранении растворимость белков мороженой рыбы постепенно понижается.

Это понижение однако значительно больше у рыбы, замороженной в состоянии расслабления, чем у рыбы, замороженной сразу после убоя и в состоянии окоченения. Так, у рыбы, замороженной в состоянии расслабления, количество растворимого белка упало до 21,3%, а у рыбы, замороженной сразу после убоя и в состоянии окоченения, соответственно — до 34,2 и 38%.

Таблица 8

Длительность хранения рыбы, недели	Содержание растворимого белка в рыбе		
	сразу после убоя	в состоянии окоченения	в состоянии расслабления
Свежая рыба			
0	<u>10,6</u>	<u>14,1</u>	<u>12,4</u>
	57,6	76,5	66,7
Мороженная рыба			
2	<u>10,3</u>	<u>9,5</u>	<u>9,2</u>
	55,9	51,8	51,8
6	<u>8,6</u>	<u>9,5</u>	<u>4,6</u>
	46,7	51,6	25,1
26	<u>6,3</u>	<u>7,0</u>	<u>3,9</u>
	34,2	38,0	21,3

Примечание. В дробях: числитель - в г/100 г мяса; знаменатель - в %.

Третья серия опытов проводилась на той же рыбе, что и первая, и заключалась в центрифугировании растворов белков, полученных из рыбы после разных сроков ее хранения.

Результаты опытов представлены на рис.6, из которого видно, что до 10 недель хранения количество осажденного из раствора белка постоянно увеличивается, что указывает на укрупнение среднего размера белковых частиц в растворе, т.е. их агрегацию.

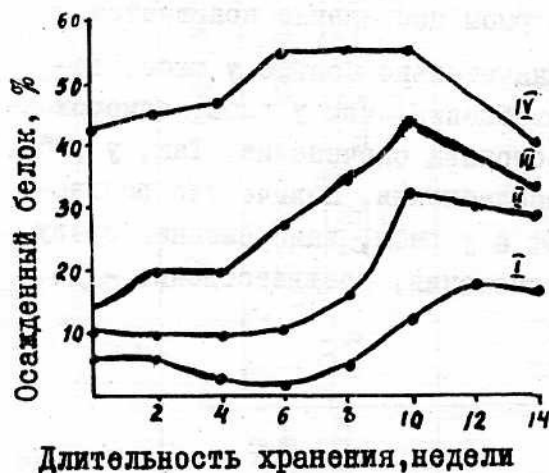


Рис.6. Осаждение белков из растворов, полученных из мороженной рыбы разных сроков хранения:

$$\begin{aligned}
 I & - \frac{1000}{15}; 2 - \frac{12000}{15}; \\
 3 & - \frac{17000}{15}; 4 - \frac{17000}{180};
 \end{aligned}$$

Динамика изменения количества осажженных белков совпадает с динамикой понижения растворимости актомиозина.

По-видимому, процессы агрегации белковых частиц и понижения растворимости белков следуют один за другим при хранении мороженой рыбы.

Уменьшение количества осажженных белков наступает после 10 недель хранения мороженой рыбы, что совпадает с повышением растворимости белков саркоплазматической фракции, за счет которой уменьшается средний размер белковых частиц.

Таким образом, при хранении мороженой рыбы на протяжении некоторого срока хранения (до 10 недель) постоянно увеличивается средний размер частиц растворимых белков, Эта агрегация сопровождается дальнейшей потерей растворимости части агрегированных белков и относится главным образом к актомиозину, имеющему наиболее высокий молекулярный вес.

После хранения в течение 10 недель относительное содержание белков с высоким молекулярным весом сильно уменьшается, а количество белков саркоплазмы, переходящих в раствор, значительно возрастает. Этим, возможно, объясняется уменьшение относительного количества осаждаемых из раствора белков, полученных из рыбы после 10 недель хранения.

Изменение белков мяса рыбы при дефростации

Порядок проведения опытов при наблюдении за растворимостью белков мяса рыбы при дефростации был следующим.

Отбирались кусочки мяса из мороженого филе, хранившегося 6 и 29 недель, приготовленного из рыбы в разном посмертном состоянии (сразу после убоя, в состоянии окоченения и в состоянии расслабления), которые немедленно измельчались в гомогенизаторе в растворе соли.

Остальную часть мороженого филе дефростировали на воздухе при температуре +18, +20°C и из него отбирали сразу после дефростации кусочки, которые направляли также на анализ.

Результаты наблюдения за изменением растворимости белков в процессе дефростации представлены в табл.9.

Таблица 9

Продолжительность хранения мороженой рыбы, недели	Содержание растворимого белка					
	в г на 100 г мяса в замороженной рыбе			в % к общему содержанию белковых веществ в замороженной рыбе		
	сразу после убоя	в состоянии окоченения	в состоянии расслабления	сразу после убоя	в состоянии окоченения	в состоянии расслабления
6	<u>8,6</u>	<u>9,5</u>	<u>4,6</u>	<u>46,7</u>	<u>51,6</u>	<u>25,1</u>
	8,0	15,0	6,1	43,5	80,5	33,3
29	<u>6,9</u>	<u>7,0</u>	<u>3,2</u>	<u>34,2</u>	<u>38,0</u>	<u>21,3</u>
	7,5	8,4	4,1	40,7	45,6	22,4

Примечание. В дробях: числитель - до дефростации; знаменатель - после.

Из таблицы видно, что независимо от посмертного состояния рыбы до замораживания и срока хранения ее с момента замораживания до дефростации количество растворимых белков у дефростированной рыбы оказалось во всех случаях выше, чем у мороженой рыбы до дефростации. Исключение представляет лишь случай дефростации рыбы, замороженной сразу после убоя и дефростированной через шесть недель хранения, когда содержание растворимых белков в мороженой рыбе было несколько выше (46,7%), чем в дефростированной (43,5%).

Исходя из наших исследований карпа (Быков, 1963), можно предположить, что изменение растворимости белков в процессе дефростации происходит в тот момент, когда температура в мясе рыбы соответствует зоне температуры максимального кристаллообразования. Опыт на треске подтвердил это предположение. Исследовалась рыба, хранившаяся в течение 14 недель и дефростированная на воздухе при температуре +18, +20°C.

Перед началом дефростации и в процессе ее по мере повышения температуры из рыбы отбирали кусочки мяса, которые немедленно направляли на исследование для определения общего содержания растворимых белков.

Результаты наблюдения за изменением растворимости белков в зависимости от повышения температуры в теле дефростируемой рыбы представлены ниже.

Температура в теле рыбы, °C	Растворимость белков, г на 100 г мяса
-22	6,1
- 4,5	6,4
- 3	7,3
- 2	8,3
0	10,1
+15	8,3

Из приведенных данных видно, что изменение температуры в теле рыбы от -22 до -4,5°C не сопровождалось существенным изменением растворимости белков; она повышалась с 6,1 до 6,4 г на 100 г мяса. Однако при прохождении зоны температур от -4,5 до 0°C растворимость постепенно возрастала от 6,4 до 10,1 г на 100 г мяса. При дальнейшем повышении температуры до 15°C растворимость белков снова несколько понизилась (до 8,3 г на 100 г мяса).

Наблюдение за осаждением белков из растворов, полученных из рыбы, замороженной сразу после убоя, до и после ее дефростации, показало (рис.7), что средний размер частиц растворимых белков увеличивается при дефростации рыбы, если она была дефростирована сразу после замораживания и через две недели хранения в мороженом виде.

Однако при дефростации рыбы, хранившейся 12 недель, количество осажденных при центрифугировании белков практически не изменялось.

Таким образом, дефростация рыбы, как правило, сопровождается повышением растворимости белков, при этом средний размер частиц растворимых белков увеличивается, когда рыба хранится до дефростации непродолжительное время

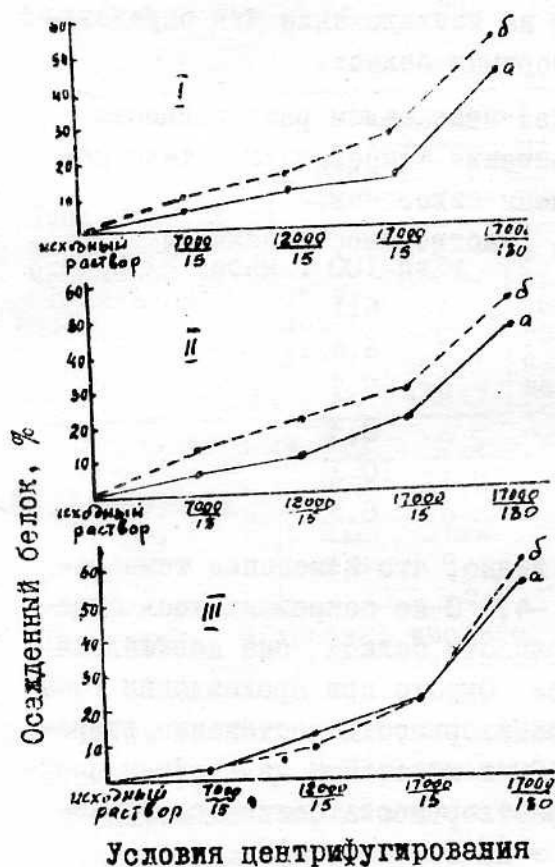


Рис. 7. Осаждение белков из раствора, полученного из замороженной рыбы (а) и дефростированной (б) спустя различное время после замораживания: I - сразу; II - после двух недель хранения; III - после 12 недель хранения.

(0-2 недели), а при длительном хранении мороженой рыбы до дефростации (до 12 недель) изменения среднего размера частиц растворимых белков не наблюдается.

З а к л ю ч е н и е

В процессе холодильной обработки рыбы (трески) - хранения в охлажденном виде, замораживания, хранения в мороженом виде и дефростации - свойства мышечных белков (растворимость, средний размер частиц белковых экстрактов, получаемых при растворении белков мяса рыбы в солевом растворе) изменяются.

Общее содержание растворимых белков мяса рыбы увеличивается в результате наступления посмертного окоченения при хранении рыбы в охлажденном виде.

При этом размер частиц в растворе, получаемом из рыбы, находящейся в состоянии посмертного окоченения, увеличивается по сравнению со средним размером частиц в растворе, получаемом из рыбы сразу после убоя до наступления посмертного окоченения.

Это увеличение среднего размера частиц в результате наступления у рыбы посмертного окоченения можно объяснить образованием актомиозина из актина и миозина, имеющего более высокий молекулярный вес, чем составные части его — актин и миозин.

В процессе замораживания рыбы общее содержание растворимых белков практически не изменяется, когда она замораживается сразу после убоя, а также в состоянии посмертного окоченения, и уменьшается, когда рыба замораживается в состоянии расслабления после окоченения.

Средний размер белковых частиц в растворе увеличивается в результате замораживания рыбы сразу после убоя, и, наоборот, уменьшается в результате замораживания рыбы в состоянии посмертного окоченения.

Однако при замораживании рыбы в состоянии расслабления после окоченения наблюдается лишь незначительное уменьшение среднего размера белковых частиц. Увеличение среднего размера белковых частиц, наблюдаемое при замораживании рыбы сразу после убоя, по-видимому, связано с образованием актомиозина из актина и миозина. Уменьшение среднего размера белковых частиц при замораживании рыбы в состоянии окоченения можно объяснить диссоциацией актомиозина на актин и миозин.

Это же подтверждается опытом замораживания рыбы в состоянии расслабления, когда в свежей рыбе до замораживания актомиозин находится, как известно, в диссоциированном состоянии, и в процессе замораживания средний размер частиц растворимых белков практически не изменяется. Некоторое незначительное уменьшение среднего размера белковых частиц в этом случае следует объяснить протеолитическими процессами распада белковых молекул.

Таким образом, наблюдаемая при замораживании рыбы агрегация и дезагрегация белков, растворимых в солевых растворах, может быть объяснена теми же процессами, что и в свежей рыбе, а именно, образованием актомиозинового комплекса из актина и миозина и его диссоциацией на актин и миозин, так же, как и в свежей рыбе, при наступлении у нее посмертного окоченения и его разрешения.

Во время хранения мороженой рыбы в течение 24 недель растворимость мышечных белков постепенно понижается. При этом растворимость актомиозиновой фракции на протяжении всего срока понижается, а саркоплазматической — сначала уменьшается (до 10 недель хранения), а затем снова несколько увеличивается. Понижение растворимости белков совпадает с соответствующим увеличением среднего размера частиц растворимых белков.

Хранение мороженой рыбы до 10 недель сопровождается постоянным увеличением среднего размера частиц растворимых белков, т.е. их агрегацией. Это относится, по-видимому, к актомиозину, имеющему наиболее высокий среди других белков молекулярный вес.

После 10 недель хранения, когда значительная часть белков актомиозиновой фракции перешла в нерастворимое состояние, а количество растворимых белков саркоплазматической фракции стало увеличиваться, средний размер частиц растворимых белков в растворе стал уменьшаться за счет относительного увеличения количества белков саркоплазматической фракции, имеющих меньший молекулярный вес, чем молекулярный вес белков актомиозиновой фракции.

Дефростация рыбы, как правило, сопровождается повышением растворимости белков, независимо от того, в какой стадии посмертного состояния рыба находится перед замораживанием.

При дефростации средний размер белковых частиц увеличивается, когда мороженная рыба хранится до дефростации не продолжительное время (до двух недель), а при длительном хранении (12 недель) изменения среднего размера частиц растворимых белков не происходит.

Л и т е р а т у р а

- Бресслер С.Е. Введение в молекулярную биологию. Изд. 2-ое. Изд-во "Наука", 1966.
- Быков В.П. Влияние дефростации рыбы ТВИ на ее качество. Гос.изд-во техн.лит-ры УССР. Доклады и сообщения к Всесоюзной конференции по новым физическим методам обработки пищевых продуктов, 1963.
- Ганелина Л.Ш. Влияние растяжения мышечной модели на ее устойчивость к денатурирующим воздействиям. Цитология. Т.4, № 2, 1962.
- Поглазов Б.Ф. Структура и функции сократительных белков. Изд-во "Наука", 1965.
- Connell, I.I. Studies on the proteins of fish skeletal muscle. Denaturation and aggregation of cod myosin. "Biochem. J.", 75, 1960.
- Dyer, W.I., French, N.V., Snow, I.M. Proteins in fish muscle. Extraction of protein fractions in fresh fish. "J. Fish. Res. Bd. Can.", 1950, N 7, 10.
- Heen, E. and Karsti. Fish and shellfish freezing. "Fish as Food", v. IV, Part 2, 355, 1965.
- Howe, I.E. Industrial and Engineering Chemistry. Analytical Edition. Published by the American Chem. Soc., vol. 14, 1943, N 3.
- Seagran, L.H. Analysis of the protein constituents of drip from thawed fish muscle. "Food Res.", v. 23, 1950, N 2.
- Taneko Suzuki, Koichi Kanka and Takeo Tanaka. Protein denaturation of fish protein in liquid nitrogen. The Technology of Fish Utilization. Fish. News, London, 1965.