

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет
имени И. Т. Трубилина»

Факультет перерабатывающих технологий

Кафедра технологии хранения и переработки
животноводческой продукции

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
ИЗ ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ
(Часть 1)**

Методические указания

к выполнению практических работ по теме:
«Биохимические свойства животных тканей» для обучающихся по
направлению подготовки 19.04.03 Продукты питания
животного происхождения

Краснодар
КубГАУ
2019

Составители: Н. Н. Забашта, А. А. Нестеренко

Научные основы повышения эффективности производства пищевых продуктов из животного сырья (Часть 1) : метод. указания к выполнению практических работ / сост. Н. Н. Забашта, А. А. Нестеренко. – Краснодар : КубГАУ, 2019 – 44 с.

Методические указания включают: теоретическую часть, цель работы, особенности техники выполнения работы, порядок оформления отчета о выполнении работы, контрольные вопросы и библиографический список, технику безопасности и предназначены для практических занятий по темам: «Прижизненное формирование функционально-технологических свойств мясного сырья», «Научные основы и технологические приемы обеспечения качества и безопасности мяса и мясных продуктов. Причины появления пороков качества мяса», «Технологические и биохимические характеристик послеубойного изменения в животных тканях».

Предназначены для обучающихся по направлению подготовки 19.04.03 Продукты питания животного происхождения.

Рассмотрено и одобрено методической комиссией факультета перерабатывающих технологий Кубанского госагроуниверситета, протокол № 1 от 18.09.2019.

Председатель
методической комиссии

Е. В. Щербакова

- © Забашта Н. Н., Нестеренко А. А., составление, 2019
- © ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина», 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ.....	4
БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ	5
Механизм автолиза и автолитические превращения мышечной ткани.....	6
Биохимические свойства крови.....	11
Биохимическая активность животных тканей	14
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1	
АНАЛИЗ ГЛУБИНЫ АВТОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ	22
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2	
АНАЛИЗ РАБОТЫ КАТЕПСИНОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ.....	27
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ	30
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА.....	34
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	37

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Обучающиеся могут быть допущены к работе в лаборатории после того, как пройдут первичный инструктаж установленной формы.

При выполнении анализов все, находящиеся в лаборатории, должны быть одеты в халаты. В процессе работы не допускается захламленности рабочего места. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом, пробовать на вкус реактивы, пить из химической посуды, оставлять какое – либо вещество в посуде без соответствующей надписи. При включении электроприборов необходимо сначала получить инструктаж у преподавателя или лаборанта. Используемая в лаборатории стеклянная посуда – стаканы, колбы – не должны иметь сколов и трещин. При перемешивании стеклянной палочкой нужно избегать ударов по стенкам сосуда, что может привести к трещинам. Нельзя нагревать химическую посуду без асбестовой сетки.

Работать с концентрированными веществами следует в защитных очках, резиновых фартуках и перчатках, чтобы избежать ожогов при попадании на кожу. При работе с концентрированной серной кислотой ее необходимо вливать по стеклянной палочке в воду, а не наоборот.

Разлитые щелочи и кислоты необходимо нейтрализовать немедленно, а затем тщательно смыть водой. Точные дозы концентрированных кислот, щелочей и других агрессивных жидкостей отмеривают пипеткой с резиновой грушей или пипеткой с предохранительным шариком. Для нейтрализации щелочей применяют растворы борной или 8%-ной уксусной кислот, для нейтрализации кислот – 5%-ный раствор пищевой соды.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

Рациональное использование животного сырья основано на знании не только химического состава, но и особенностей протекания биохимических процессов в органах и тканях при жизни животного, после ее прекращения и при технологической обработке.

Прижизненные процессы управляемы и многообразны, протекают в строгом соответствии и взаимоувязаны. Большую роль в них играют биологически активные вещества – ферменты и гормоны. Многие ткани животных организмов синтезируют в той или иной мере эти вещества, обеспечивая жизнедеятельность организма. После убоя животных эти ткани служат источниками для получения биологически активных веществ и изымаются в процессе разделки туш. Например, поджелудочная железа, гипофиз, слизистые оболочки желудков и кишечника и др.

После смерти животного, с прекращением обмена веществ, основным биохимическим процессом при переработке сырья биологического происхождения является *автолиз* (от греч. *autos* – сам и *lysis* – растворение), основу которого составляют ферментативные процессы, при жизни связанные с функцией координированного движения. Автолизом называется процесс распада веществ и тканей под действием ферментов самих тканей. При жизни животного он возможен только в патологических случаях, например, при недостаточном снабжении какого-либо органа кровью.

В послеубойный период свойства всех тканей животного организма значительно изменяются, особенно существенны изменения мышечной ткани, в которой ферменты (протеазы, карбогидразы, эстеразы, ферменты гликолиза и другие) – катализируют реакции распада. Процесс становится необратимым, протекающим только в одном направлении. Особая роль в процессе автолиза принадлежит внутриклеточным протеазам – катепсинам.

Итак, при переработке убойных животных ткани можно разделить на две группы: к первой относятся те, в которых протеолиз происходит под действием внутриклеточных протеаз типа катепсинов (мышечная ткань, печень, и др.); ко второй – ткани, в которых синтезируются внеклеточные протеазы типа пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы, дипептидазы, аминопептидазы (слизистая желудка, поджелудочная железа и т. д.), а также гормоны. Для пер-

вой группы тканей весьма важен период автолиза, так как именно он определяет функционально-технологические свойства сырья.

Вторая группа представляет объекты для получения медицинских и технических препаратов, нашедших широкое применение в медицине и перерабатывающих отраслях АПК.

Механизм автолиза и автолитические превращения мышечной ткани

Эффективное и рациональное использование сырья предусматривает сохранение качества на всех этапах переработки, начиная от транспортировки животных на мясокомбинат и их убой до хранения готовой продукции. Определяющим условием для формирования биохимических свойств мяса и качества продуктов является уровень и характер развития автолитических процессов в животных тканях. Изменения, происходящие в послеубойный период в мышечной ткани, имеют важное практическое значение, оказывают существенное влияние на пищевую ценность мяса и его потери в процессе технологической обработки.

Современные представления о механизме автолитических процессов базируются на ферментативной природе посмертных изменений мышечной ткани, установленных в 30-х годах И.А. Смородинцевым. Наиболее важное значение здесь отводится двум основным ферментным системам. Одна из них, очевидно, связана с функцией движения и регулирует сокращение – расслабление, другая – катализирует непрерывный распад главных структурных элементов мышечного волокна по типу гидролиза. Роль каждой из этих двух систем в развитии этапов автолиза различна, но их функции тесно связаны между собой.

Начиная с момента убоя в мышечной ткани происходят непрерывные изменения под действием тканевых ферментов. В основе всех изменений, приводящих к развитию посмертного окоченения, его последующему разрешению и завершению созревания мяса с приобретением им функциональных и технологических свойств, лежат ферментативные реакции.

В послеубойный период с развитием окоченения главную роль играют ферменты сокращения – расслабления, вызывающие изменения сократительного аппарата – миофибрилл, распад АТФ и других несущих в себе запас энергии веществ, а также обеспечивающие синтез АТФ за счет превращения углеводов, и прежде всего гликогена.

В сложных процессах автолитических превращений мышечной ткани важная роль принадлежит изменениям углеводной системы. Накопление продуктов их автолитического распада существенно влияет на физико-химические и биохимические изменения белков мышечной ткани.

В комплексе биохимических превращений, происходящих в начальный период автолиза мышц, наиболее отчетливо проявляются превращения гликогена и изменения органических фосфорных соединений.

Автолитические превращения гликогена связаны с его фосфоролитическим распадом и дальнейшим процессом анаэробного гликолиза, который приводит к необратимому накоплению молочной кислоты и снижению рН мышечной ткани. Кроме того, мышечный гликоген в процессе автолиза подвергается интенсивному гидролитическому амилолитическому распаду, ведущему к накоплению в мышечной ткани редуцирующих углеводов. Таким образом, автолитический распад мышечного гликогена обусловлен двумя параллельно протекающими процессами: анаэробным гликолизом с образованием молочной кислоты и гидролизом с образованием редуцирующих углеводов. Общие закономерности протекающих процессов, сопровождающиеся накоплением или распадом специфических биохимических веществ.

Таким образом, методы химического и биохимического анализа тканей весьма полезны в оценке глубины и характера автолитических превращений тканей мяса.

Состояние автолиза тканей легко определить по внешним признакам визуально. Сразу после убоя мышечная ткань расслаблена, поскольку в клетках содержится АТФ, уровень которой поддерживается в результате ряда хаотично протекающих реакций. Затем через несколько часов ранее расслабленные мышцы теряют свою гибкость, эластичность, становятся твердыми и непрозрачными. Наступает посмертное окоченение, которое сохраняется в течение 24–28 ч. По истечении 24–28 ч все более заметными становятся признаки разрушения клеточных структур: ядра сморщиваются, появляются поперечные разрывы мышечных волокон. Накопление специфических химических веществ в процессе автолиза служит основой органолептической оценки состояния сырья.

Можно выделить ряд объективных биохимических, физико-химических, морфологических признаков оценки этапов послеубойного созревания мяса.

Так, процесс созревания мяса связан с переходом части водорастворимых белков мышечных волокон в коагулированное состояние, причем особенно сильный сдвиг в соотношении общего аминного и аммиачного азота водной вытяжки мяса при 4 °С приходится на 6-й час после прекращения жизни животного. Массовая доля коагулирующих белков водной вытяжки составляет 60 % общего азота вытяжки.

Отношение миозина к миогену уменьшается почти в три раза к 24-му часу и остается затем постоянным. Отношение азота растворимого белка к белковому азоту к 24-му часу уменьшается в два раза – с 0,6 до 0,3 – и стабилизируется. Общее количество экстрактивных веществ держится на стабильном уровне в течение 10 сут. Массовая доля молочной кислоты составляет 0,7–0,8 %; редуцирующих сахаров – 0,2 %; рН 5,6–5,7 (данные для однотипных животных: коровы в возрасте 6-7 лет, средней упитанности).

Наиболее важной составной частью мяса по объему, питательной и биологической ценности является поперечнополосатая мышечная ткань туш убойных животных. В этой связи важно знать не только последовательность послеубойных изменений мышечной ткани, но и иметь достоверный метод их определения.

Важно отметить, что в процессе биохимических превращений белковых и азотистых экстрактивных веществ в мясе накапливаются химические предшественники вкуса и аромата мяса.

Интенсивный обмен белков в животных тканях требует наличия системы, осуществляющей интенсивный распад белковых веществ. В связи с ведущим значением биохимических ферментативных процессов для направленного регулирования свойств мясного сырья и готовых продуктов большое практическое значение имеют тканевые ферментные системы мяса. Действие протеолитических ферментов в животных тканях в послеубойный период направлено на расщепление собственных компонентов и структур клеток.

Протеиназы, осуществляющие гидролиз белков, подразделяют на экзо- и эндопептидазы. Место приложения первых – концевые участки полипептидных цепей, вторых – внутренние участки цепи. Экзопептидазы содержатся как в саркоплазме и саркоплазматическом ре-

тикулуме, так и в лизомах, тогда как внутриклеточные эндопептидазы находятся, как правило, в лизосомах клеток.

Прижизненная роль внутриклеточных протеолитических ферментов многогранна: они участвуют в катаболизме белков и доставке пластического материала для биосинтетических реакций, 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 здесь отводится катепсинам.

Катепсины – кислые протеиназы, проявляют максимальную активность при рН 2,0–5,0, широко представлены в органах и 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.

В настоящее время в мышечной ткани идентифицирован ряд ферментов эндопептидазного действия – катепсины В₁, D, H, L, G и экзопептидазы – катепсины А, В₂ и С.

Катепсин В₁ является тиоловой эндопептидазой и активируется SH-соединениями, имеет оптимум активности при рН 6,0, проявляет более высокую, по сравнению с коллагеназой, способность к гидролизу коллагена в кислой среде и напоминает папаинтиоловую протеиназу растительного происхождения, широко используемую для мягчения мяса.

Катепсин D – карбоксильная эндопептидаза, проявляющая активность при рН 2,8–4,0, расщепляет низкомолекулярные пептиды, имеет сродство к пептидным связям, образованным гидрофобными боковыми радикалами, и поэтому сходен с пепсином – пищеварительным ферментом, выделяемым слизистой оболочкой желудка. Катепсин E

отличается от катепсина D субстратной специфичностью, более кислым характером и лабильностью. Катепсин H относится к эндоаминопептидазам, способен гидролизовать белки и пептиды с максимальной активностью при рН 6,0. Катепсин L – тиоловая эндопептидаза, присутствует в лизосомальной фракции, гидролизует различные белки с максимальной активностью при рН 5,0.

Лизосомальные экзопептидазы были открыты позднее эндопептидаз. В настоящее время установлено, что они наиболее активны на последних стадиях расщепления белковых молекул, когда под действием эндопептидаз образовалось много новых концевых групп.

Катепсин A – лизосомальная карбоксипептидаза, проявляет наибольшую активность по отношению к пептидам при рН около 5,6–6,9, не способен гидролизовать крупные молекулы белка, однако проявляет синергизм с действием катепсина D на белки мышц. Отличительной чертой катепсина A является способность гидролизовать синтетический субстрат карбобензоксиглутамил-L-тирозин.

Катепсин B₂ – относительно неспецифическая карбоксипептидаза, активируемая сульфгидрильными соединениями; гидролизует полипептиды до свободных аминокислот с оптимумом рН 5,5–5,6. Катепсин B₂ осуществляет глубокий гидролиз полипептидных фрагментов, образующихся в результате действия эндопептидаз.

Катепсин C является типичной тиоловой экзопептидазой, которая расщепляет пептиды и их производные с оптимумом рН 5,0–6,0. Являясь своеобразной аминопептидазой, принимает участие в деградации белка в комплексе с другими катепсинами, или выполняет функции трансфераз.

В настоящее время в саркоплазме, митохондриях и рибосомах клеток выделен ряд протеиназ, проявляющих максимальную активность в нейтральной среде (рН 7,0–8,0) при наличии ионов кальция. Кальцийзависимые тканевые протеиназы получили название кальпаинов.

Лизосомальные протеиназы – катепсины и кальцийзависимые протеиназы – кальпаины участвуют в автолитической деструкции тканей двояким образом: непосредственно воздействуя на основные компоненты клеточных элементов и путем активации других протеолитических ферментов.

Определяющую роль в деградации белков играют катепсины L, B, H и D, при этом важное место в процессе внутриклеточного протеолиза отводится катепсину D.

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

В результате действия катепсинов на белки при правильном развитии автолитических процессов мясо приобретает нежность, сочность, выраженные 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.

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

Таким образом, имея объективную информацию о характере и глубине изменений структурных компонентов тканей, активности катепсинов, возможно предполагать условия максимального использования животных тканей для получения качественных мясных продуктов.

Биохимические свойства крови

Кровь убойных животных – один из важнейших источников высокоценного животного белка. По содержанию белка кровь практически не отличается от мяса и содержит лишь на 5–10 % больше воды. Реакция среды слабощелочная, почти нейтральная. Кровь обладает способностью к пенообразованию и образованию эмульсий. Коэффициент перевариваемости крови составляет 94–96 %, т. е. она почти полностью усваивается организмом. Кроме того, содержание в ней биологически активных веществ делает ее более полноценным источником продуктов питания.

В производстве мяса и мясопродуктов используют цельную кровь, плазму (фракцию крови без форменных элементов) и сыворотку (плазма без фибриногена). Особенностью цельной крови и плазмы является свертывание.

При глубоких повреждениях кровь обильно вытекает из сосудов и через некоторое время свертывается в результате превращения растворимого белка плазмы фибриногена в нерастворимый фибрин. Механизм свертывания крови очень сложен и регулируется с помощью каскадной системы реакций, протекающих с участием ферментов и без них.

«Пусковым механизмом» свертывания крови является тканевый фактор тромбопластин, являющийся липопротеидом, который проявляет протеолитическую активность и охарактеризован еще недостаточно. При повреждении сосудов он освобождается и инициирует свертывание. В результате реакций тромбопластина с ионами Ca^{2+} и некоторыми белками плазмы (проакцелерином и проконвертином) образуется фермент тромбокиназа.

Второй путь образования тромбокиназы связан с распадом тромбоцитов и выделением из них тромбопластина, который впоследствии взаимодействует с ионами Ca^{2+} и некоторыми глобулинами плазмы.

Последняя стадия механизма свертывания – протеолиз фибриногена тромбином с образованием нерастворимого фибрина.

Итак, тромбин – важный фермент системы свертывания крови, активно гидролизующий фибриноген. Способность тромбина специфически расщеплять связь между остатками аргинина и глицина свидетельствует о сходстве тромбина с трипсином. Тромбин имеет молекулярную массу 33 700 и состоит из двух полипептидных цепей (А и В).

Последовательность аминокислот вокруг серина в активном центре тромбина: Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro аналогична их последовательности в активном центре сериновой протеиназы поджелудочной железы. Как и панкреатические сериновые протеиназы, тромбин синтезируется в виде неактивного зимогена – протромбина, который имеет молекулярную массу 66 000. Протромбин синтезируется в печени при наличии достаточного количества витамина К.

Переход протромбина в тромбин эффективно протекает при участии фермента тромбокиназы, в присутствии ионов Ca^{2+} и других факторов свертывания.

В результате протеолитического расщепления связи аргинин – треонин с аминоконца протромбина высвобождается фрагмент молекулярной массой 32 000. Последующее расщепление связи аргинин – лейцин приводит к высвобождению активного тромбина.

Таким образом, в результате совершения серии протеолитических реакций протромбин превращается в активную форму – тромбин с ярко выраженной специфичностью к разрыву пептидных связей между аргинином и глицином. Такая специфичность действия тромбина обеспечивает превращение фибриногена в фибрин в процессе свертывания крови.

Таким образом, свертывание крови включает эффективно регулируемую серию превращений неактивных зимогенов в активные ферменты, ведущую в конечном итоге к образованию тромбина и затем фибрина. За небольшим исключением все активируемые факторы свертывания представляют собой сериновые протеиназы. Все они ингибируются, подобно трипсину, диизопропилфторфосфатом и гидролизуют пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и глицина.

Свертывание крови в значительной степени затрудняет ее промышленную переработку. Для исключения или замедления свертывания крови выводят или нарушают активизацию одного из компонентов системы. Вещества, вызывающие целевое действие, называются антикоагулянтами или стабилизаторами. Химическая природа и механизм их действия на свертывающую систему различен. В связи с этим антикоагулянты подразделяются на две большие группы – физиологические и нефизиологические. Действие их, как правило, очень быстрое. Введение стабилизаторов производят сразу после изъятия крови до начала образования сгустка. Физиологические стабилизаторы предотвращают прижизненное свертывание крови, инактивируя важнейшие системы свертывания. К ним относятся гепарин, антитромбопластин, антитромбин и др.

При пропускании крови, например, через слой ионообменной смолы 50 % кальция заменяется натрием. Снизить концентрацию Ca^{2+} достаточно вдвое для того, чтобы кровь не свертывалась. Существуют и другие подходы к стабилизации крови.

Кровь убойных животных широко применяется для производства мясопродуктов. Это связано с тем, что белки плазмы крови, помимо высокой пищевой и биологической ценности, имеют высокие функциональные свойства: высокую эмульгирующую, водосвязывающую способность, обладают способностью к геле-, пено- и волокнообразованию, что обусловлено наличием альбуминов и фибриногена в ее составе.

Биохимическая активность животных тканей

При жизни животных организмов некоторые органы и ткани способны накапливать и секретировать биологически активные вещества, которые выполняют важнейшие функции в поддержании жизнедеятельности. При убое сельскохозяйственных животных совокупность таких источников называют ферментно-эндокринным сырьем и используют для производства органотерапевтических препаратов, которые в свою очередь имеют широкое применение в теоретической науке, медицине, фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и при переработке пищевого сырья. По механизму действия, свойствам, физиологическому и лечебному эффекту эти вещества подразделяют на гормоны (гормональные препараты) и ферменты (ферментные препараты). Гормоны выделяют главным образом из эндокринных желез (железы внутренней секреции). К такому сырью относятся гипофиз, паращитовидные железы, щитовидная, поджелудочная, половые железы, надпочечники. Ферментные препараты получают преимущественно из слизистой оболочки желудков свиней и сычугов крупного рогатого скота, молочных ягнят и телят, слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, а также поджелудочной и слюнной желез.

Важнейшими условиями правильной организации сбора ферментно-эндокринного сырья являются быстрое извлечение его из туши животного, соблюдение санитарно-гигиенических требований, предотвращающих загрязнение и микробное инфицирование.

Под каталитическим воздействием ферментов осуществляются процессы гидролиза, фосфоролиза, переноса различных групп (метильных радикалов, остатков фосфорной кислоты и т. д.), окисления, восстановления и т. д. При посредстве ферментов реализуется влияние как внутренних, генетических, так и внешних, природных факторов на развитие организма. Тончайшие различия строения ферментов определяют видовые особенности организмов, а в нарушении биосинтеза некоторых из них лежат причины возникновения наследственных и других заболеваний.

Будучи выделены из клеток, ферменты не утрачивают способности осуществлять каталитическую функцию. На этом основано их практическое применение в пищевой, легкой, фармацевтической промышленности. В связи с этим ткани животных, в которых активно синтезируются ферменты, имеют практическое значение как источ-

ники для их получения. Интерес представляют ткани низкой пищевой ценности, клетки которых синтезируют ферменты.

Традиционно с этой целью используются слизистые оболочки, богатые пищеварительными ферментами, которые в метаболизме животного организма выполняют функции гидролитического распада пищевых веществ: 1) секрет слюнных желез (слюна), особое значение в функции которой принадлежит амилазе, а также лизоциму; 2) желудочный сок, содержащий пепсин, реннин и липазу (первые два из которых активируются соляной кислотой желудочного сока); 3) секрет поджелудочной железы, желчь и кишечный сок, богатые трипсином, химотрипсином, липазой, амилазой, рибонуклеазой и др.

Пепсин, трипсин и химотрипсин выделяются железистыми клетками в виде неактивных предшественников – зимогенов: пепсиногена, трипсиногена и химотрипсиногена. Их активные центры блокированы фрагментами полипептидной цепи, после отщепления которых ферменты приобретают активность.

В группе протеолитических ферментных препаратов животного происхождения наибольший практический интерес представляют ферментные препараты, вырабатываемые из поджелудочной железы убойных животных, а также пепсин, вырабатываемый из слизистой оболочки сычугов крупного рогатого скота.

Поджелудочная железа содержит комплекс ферментов, около 50 % которых составляют трипсин и химотрипсин. Они выделены в кристаллическом виде и всесторонне изучены. Комплексный препарат ферментов поджелудочной железы называют панкреатином.

Отечественной промышленностью вырабатывается достаточно широкий спектр ферментных препаратов для медицины, препаративной практики, пищевой и перерабатывающей промышленности.

Гормоны осуществляют гуморальную регуляцию обмена веществ и координацию функций организма. Они регулируют размножение, рост и развитие организма, влияют на дифференцировку тканей, формирование функций, на поддержание гомеостаза центральной нервной системы, участвуют в адаптационных реакциях на внешние раздражители (стресс) и т. д.

Гормоны взаимодействуют со специфическим для данного гормона рецептором (часто это белки), вызывая ряд биохимических изменений в клетке. В зависимости от механизма взаимодействия гормонов с рецептором все гормоны можно разделить на две группы: 1) гормоны, не проникающие в клетку и взаимодействующие с рецеп-

торами на наружной стороне мембраны; 2) гормоны, проникающие внутрь клетки и взаимодействующие с рецепторами в цитоплазме клеток.

В клетке имеются специальные механизмы, которые прекращают действие гормонов, т. е. влияют на обратимое соединение гормон – рецептор. Разрушение гормонов происходит в печени.

Эндокринные заболевания возникают не только при гипер- или гипопункции эндокринных желез, но также при интенсивном распаде гормонов или при нарушении функции рецепторов, без которых гормон не проявляет своего действия.

Гормонами (от греч. гормао – побуждаю, возбуждаю, поощряю) называют группу химических соединений, вырабатываемых преимущественно железами внутренней секреции, не имеющими прямого пищевого значения, и оказывающими регулирующее влияние на процессы обмена веществ и функционирование органов и тканей.

Гормоны интегрируют обмен веществ, регулируя соподчиненность и взаимосвязь разнообразных химических реакций в различных органах и тканях и организме в целом. В свою очередь, деятельность желез внутренней секреции, продуцирующих гормоны, контролируется центральной нервной системой.

Действие гормонов в организме следующее: 1) изменяют проницаемость мембран для определенных веществ, например, для глюкозы, аминокислот; 2) регулируют активность отдельных ферментов путем аллостерического воздействия; 3) регулируют синтез ферментов, действуя на генетический аппарат клетки; 4) влияют на образование белковой части фермента (или на распад ферментов) и образование коферментов.

Гормоны млекопитающих по химической природе можно разделить на три большие группы: 1) белки и полипептиды; 2) стероиды; 3) прочие гормоны, в том числе амины, образующиеся в ходе метаболизма из аминокислот.

Наиболее изученным и важным является гормон инсулин, химическая и пространственная структура которого расшифрована.

Некоторые полипептидные гормоны, в том числе инсулин и глюкагон, подобно протеолитическим ферментам желудка и поджелудочной железы, синтезируются в клетках эндокринных желез в виде неактивных предшественников, или прогормонов. Пример – инсулин, превращающийся в активную форму путем ферментативного отщеп-

ления части полипептидной цепи. Источники основных представителей каждой из групп гормонов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Источники основных гормонов

Наименование	Место секреции
Пептидные гормоны	
Тиролиберин	Гипоталамус
Кортикотропин	Передняя доля гипофиза
Вазопрессин	Задняя доля гипофиза
Инсулин	Поджелудочная железа
Глюкагон	То же
Стероидные гормоны	
Кортизол	Кора надпочечников
β -Эстрадиол	Яичники
Тестостерон	Семенники
Прогестерон	Желтое тело
Амины	
Адреналин	Мозговой слой надпочечников
Тироксин	Щитовидная железа

В последнее время предпринята попытка классифицировать гормоны, исходя не только из их химической природы, но и с учетом их происхождения и физиологической функции.

Известны биологические (испытание на животных) и химические способы определения гормонов. Реакции качественного определения специфичны для каждой группы гормонов.

Результатом реакции йода с крахмалом является соединение синего цвета.

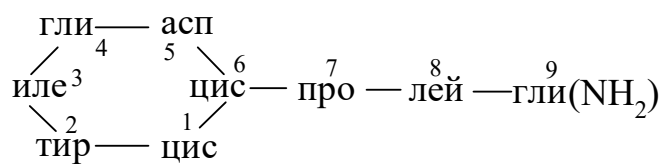
К качественным реакциям на гормоны мозгового слоя надпочечников (адреналин, норадреналин) относятся: реакция с хлоридом железа (III), с диазореактивом, с йодатом калия.

Количественные методы определения гормонов основаны на проведении специфических реакций с образованием окрашенных или флюоресцирующих продуктов, определяемых колориметрически (количественное определение адреналина по Фолину; метод основан на определении интенсивности синего окрашивания, возникающего при взаимодействии адреналина с солями фос-форновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот) или флюорометрически (например, количественное определение адреналина и норадреналина в моче). Принцип метода состоит в том, что некоторые вещества при ультра-

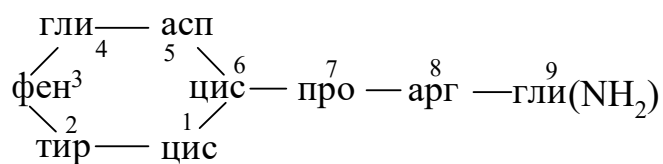
фиолетовом облучении их начинают флюоресцировать, т.е. сами становятся источником нового (вторичного) излучения. Излучение регистрируют и количественно измеряют при помощи специального прибора – флюорометра. Интенсивность флюоресценции пропорциональна концентрации вещества в растворе.

Важнейшими пептидными гормонами являются окситоцин, вазопрессин, гастрин, глюкагон, инсулин, адренокортикотропин, тиреотропин.

Окситоцин и вазопрессин – 9-членные полипептиды сходной структуры:



окситоцин



вазопрессин

Они выделены из задней доли гипофиза. Окситоцин вызывает сокращение мышечных волокон, способствует нормальному протеканию родов. Вазопрессин в известной мере сходен с окситоцином по функциональной активности: стимулирует сокращение гладких мышц сосудов, а также участвует в регуляции водного баланса организма и осмотического давления плазмы крови.

Гастрин – 17-членный пептид, выделяемый слизистой желудка. Он стимулирует секрецию желудочного сока, способствует выделению секрета поджелудочной железы, усиливает тонус и сокращение мышц желудка и тонкого кишечника.

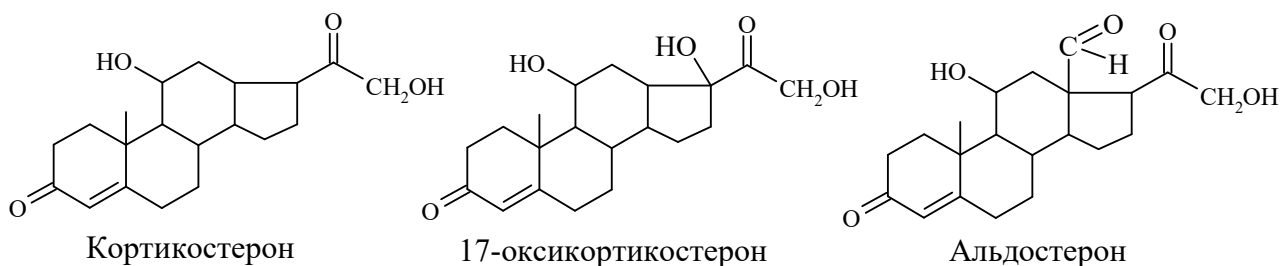
Глюкагон – 29-членный пептид, синтезируется в α-клетках островковой части поджелудочной железы, способствует деструкции углеводов в процессе гликогенолиза.

Адренокортикотропин – 39-членный пептид, продуцируемый передней долей гипофиза, оказывает разностороннее действие: повышает активность фосфоорилазы, липазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, усиливает синтез белков и нуклеиновых кис-

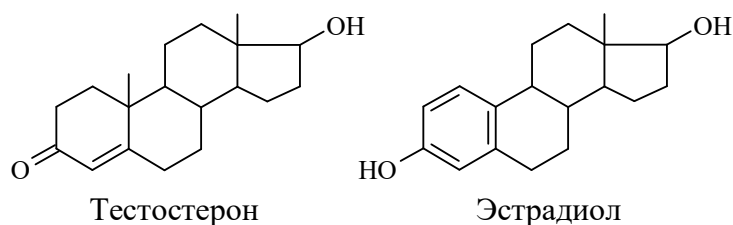
лот и т. д. Основная функция в организме сводится к регуляции биосинтеза кортикостероидов надпочечными железами.

Тиреотропин – белок, выделяемый передней долей гипофиза. Представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 28 300, состоящий из двух субъединиц с молекулярными массами 13 600 и 14 700, исключительно богатых дисульфидными мостиками (5 и 6 соответственно). Тиреотропин стимулирует деятельность щитовидной железы. В свою очередь, выделение тиреотропина регулируется по принципу обратной связи гормонами щитовидной железы.

Стероидные гормоны представляют собой производные полициклических спиртов – стеролов, у которых окислена боковая цепь. В корковом слое надпочечников продуцируется более сорока различных стероидов, которым присвоено общее название – кортикостероиды. Восемь из них являются стероидными гормонами коры надпочечников. Наибольшее распространение и значение в организме имеют кортикостерон, 17-оксикортикостерон (гидрокортизон) и альдостерон (в сумме они составляют 4/5 всех кортикостероидов коры надпочечников):



В мужских и женских половых железах, а также в надпочечных железах синтезируется 10 стероидов, обладающих свойствами половых гормонов. Важнейшее значение из них имеют тестостерон (мужской половой гормон) и эстрадиол (женский половой гормон):

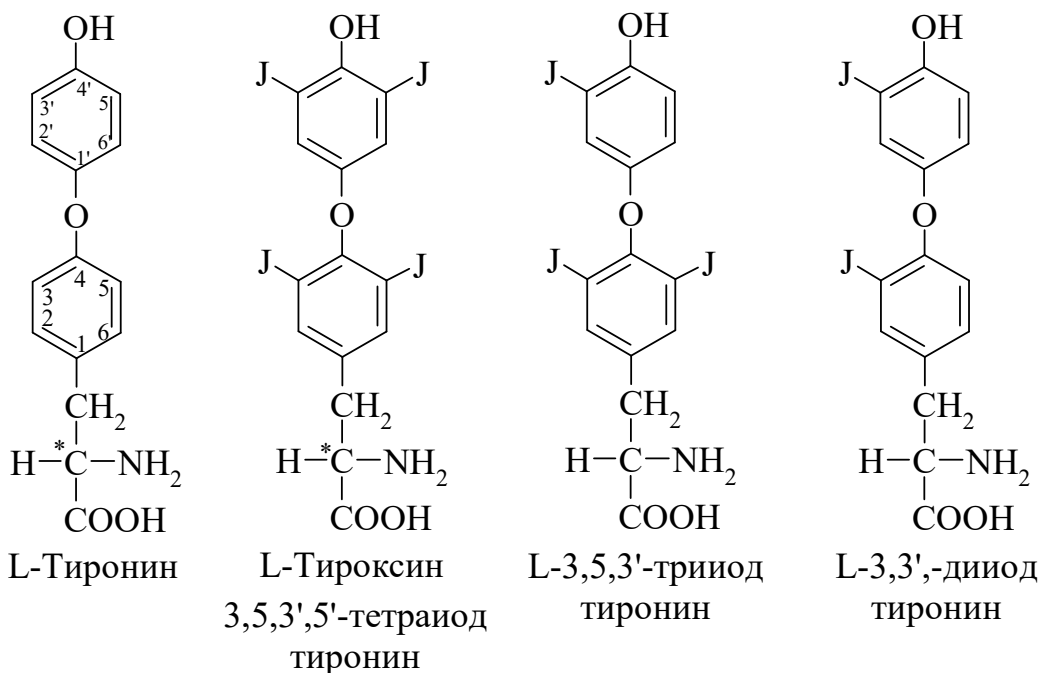


Эстрадиол принадлежит к группе эстрогенов (женских половых гормонов), которые в известной мере влияют на функционирование почти всех тканей в организмах позвоночных. Основное действие их – стимуляция роста и созревания органов размножения самок и поддержание их способности к воспроизведению. Эстрадиол оказывает

также влияние на обмен углеводов, белков и нуклеиновых кислот, активирует ряд ферментов лимоннокислого цикла.

Прочие гормоны. Из гормонов, не являющихся по своей химической природе пептидами и стероидами, у человека и животных хорошо известны адреналин, тироксин и простагландины, а также аналогичные им соединения.

Тироксин – продуцируется щитовидной железой и является пред-



ставителем группы йодтиронинов:

Биосинтез тиреоидных гормонов осуществляется в щитовидной железе при посредстве особого белка – тиреоглобулина – путем конденсации двух молекул дийодтирозина в молекулу тетраидотиронина. Связываясь со специфическими глобулинами крови, йодтиронины доставляются к клеткам организма, где проявляют свое действие.

Механизм действия йодтиронинов изучен недостаточно. Считают, что эти гормоны влияют на скорость метаболизма и потребление кислорода тканями. В итоге усиления окислительных процессов повышается интенсивность расщепления углеводов, жиров и белков в процессе обмена веществ с освобождением большого количества энергии.

Простагландины – соединения с широким спектром гормонального действия, являются производными полиеновых 20-углеродных жирных кислот, из которых они синтезируются во многих тканях человека и животных, преимущественно в репродуктивных органах.

Действие простагландинов отличается крайне разнообразными физиологическими и фармакологическими эффектами. В связи с этим

они находят все более широкое применение при создании принципиально новых лекарственных средств. Это связано с тем, что механизм их действия сводится к усилению или ослаблению влияния многих других гормонов на фундаментальные стороны обмена веществ на генетическом и других уровнях. Считают, что простагландины являются модуляторами гормон-рецепторных комплексов, т.е. способны изменять их активность, опосредуя действие гормонов.

Нестимулированный уровень гормонов очень низок (в пределах микромолярных и ниже концентраций). В силу этого их выделение, идентификация и количественное определение связаны с определенными трудностями.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

АНАЛИЗ ГЛУБИНЫ АВТОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в оценке технологической пригодности мяса на основе анализа небелковых веществ мышечной ткани. В задачи работы входит определить количественное содержание гликогена, неорганических фосфорных соединений, АТФ, глюкозы; дать органолептическую оценку мяса; оценить технологическую пригодность мяса.

Методические указания

В течение первых суток после убоя развитие посмертного окоченения приводит к снижению рН от 6,5–7,0 до 5,5–5,6, отсутствию выраженного вкуса и аромата. Сравнительные органолептические показатели в зависимости от глубины автолитических превращений даны в таблице 2.

Таблица 2 – Органолептические показатели пищи, приготовленной из мяса на разных стадиях автолиза

Наименование продукта	Несозревшее мясо	Созревшее мясо
Вареное мясо	Жесткое, сухое, отсутствует специфический приятный вкус и аромат	Нежное, сочное, со специфическим приятным вкусом и запахом
Бульон	Мутный, отсутствует специфический приятный вкус и аромат мясного бульона	Прозрачный, со специфическим приятным вкусом и ароматом

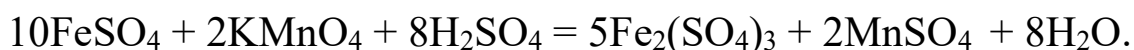
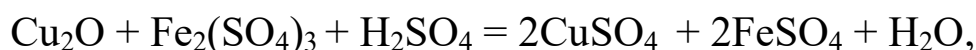
В связи с отсутствием поступления кислорода в организм ресинтез гликогена в мясе после убоя идти не может и начинается его анаэробный распад, который протекает по пути фосфоролиза и амилолиза с образованием молочной кислоты и глюкозы. Это коррелирует с изменением рН и АТФ.

Через 24 ч гликолиз приостанавливается вследствие истощения запасов АТФ и накопления молочной кислоты, подавляющей фосфоролиз.

Накопление молочной кислоты приводит к смещению рН в кислую сторону, в результате чего возрастает устойчивость мяса к действию гнилостных микроорганизмов; снижается растворимость миофибриллярных белков (изоэлектрическая точка при рН 4,7–5,4), уровень их гидратации, величина водосвязывающей способности; происходит набухание коллагена соединительной ткани; повышается активность катепсинов (рН-оптимум 5,3), вызывающих гидролиз белков на более поздних стадиях автолиза; разрушается бикарбонатная система ткани с выделением углекислого газа; создаются условия для интенсификации реакций цветообразования вследствие перехода двухвалентного железа в трехвалентное в молекуле миоглобина; изменяется вкус мяса; активизируется процесс окисления липидов.

Очевидно, общее количество и соотношение специфических продуктов биохимических реакций указывает на характер и глубину автолиза, о которых можно судить путем анализа биохимических веществ небелковой природы.

Количественное определение глюкозы в мышечной ткани проводят методом Бертрана. Метод основан на восстановлении щелочного раствора окиси меди в закись и учете последней путем воздействия на нее раствором сульфата окисного (трехвалентного) железа, сильно подкисленного серной кислотой. Количество восстановленного при этом железа определяется титрованием перманганатом калия. Процесс сводится к следующим реакциям:



Из уравнений следует, что 1 см³ раствора перманганата калия молярной концентрацией 0,1 моль/дм³ соответствует 6,35 мг меди. Зная количество миллилитров раствора KMnO₄, пошедших на титрование сульфата железа, находят, какому количеству миллиграммов меди оно соответствует, и определяют количество сахара в исследуемом растворе.

Выполнение работы по оценке глубины и характера автолитических превращений мышечной ткани определенного вида убойных животных или птицы осуществляется комплексно бригадами студентов по 2–3 человека.

Каждой бригаде выдается задание по изучению динамики изменения одного-двух конкретных биохимических показателей при рекомендованных сроках хранения. Бригады выбирают методы исследования, обосновывают выбор, проводят законченный цикл исследований в соответствии с конкретными методиками.

Объекты исследования: образцы мышечной ткани разных видов убойных животных и птицы различных сроков хранения массой по 50 г. Хранение образцов осуществляется при температуре 4 °С, относительной влажности воздуха 80 %

Материалы, реактивы, оборудование: весы технические; водяная баня; электроплитка, асбестовая сетка; масляный насос; штатив Бунзена; скальпель; кварцевый песок или толченое стекло; бумажные фильтры; порошковый асбест; песочные часы на 3 мин термометр; индикаторная бумага; фарфоровые ступки; колбы конические вместимостью 150 см³; колбы мерные вместимостью 50 и 100 см³; часовые стекла; воронки; колбы Бунзена с резиновыми пробками, в которые вставлены стеклянные фильтры № 2 или № 3; бюретки; пипетки объемные вместимостью 5, 10 и 20 см³; стеклянные палочки с резиновыми наконечниками, раствор медного купороса (реактив А); щелочной раствор сегнетовой соли (раствор Б); раствор сульфата окисного железа; раствор КМnO₄ молярной концентрацией 0,1 моль/дм³; раствор ZnSO₄ с массовой долей 15 %; раствор желтой кровяной соли с массовой долей 10 %; CaCO₃; раствор HCl с массовой долей 17 %; насыщенный раствор Na₂CO₃; толуол в капельнице.

Подготовка проб

1. Для определения рН мяса готовят водную вытяжку в соотношении 1 : 10, для чего навеску образца мяса массой (10,00 ± 0,02) г тщательно измельчают (ножницами или на мясорубке), помещают в химический стакан вместимостью 50 см³ и экстрагируют дистиллированной водой в течение 30 мин при температуре окружающей среды и периодическом помешивании стеклянной палочкой. Экстракт фильтруют через складчатый бумажный фильтр и используют для определения интересующего показателя.

2. Подготовка проб для количественного определения гликогена, молочной кислоты, АТФ в мышечной ткани – в соответствии с методическими указаниями.

3. Для приготовления вытяжки сахаров (глюкозы) навеску предварительно измельченной мышечной ткани массой ($10,00 \pm 0,02$) г тщательно растирают в ступке с 1–2 г кварцевого песка и количественно переносят в коническую колбу вместимостью 150 см^3 с 50 см^3 воды. Затем колбу ставят на 30 мин на водяную баню при температуре $70 \dots 80 \text{ }^\circ\text{C}$. Из охлажденной смеси удаляют белки и коллоидные вещества, мешающие определению сахаров, путем добавления в колбу 5 см^3 раствора сульфата цинка с массовой долей 15 % и 5 см^3 раствора желтой кровяной соли с массовой долей 10 %. Смесь перемешивают, фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и промывными водами доводят до указанного объема. На этом этапе работу можно прервать, добавив в вытяжку несколько капель толуола и закрыв колбу пробкой.

Ход работы

1. Определение рН.

рН водного экстракта мышечной ткани определяют на потенциометре (рН-метре) любой марки. Результаты фиксируют.

2. Количественное определение гликогена и молочной кислоты в мышечной ткани. Выполняют в соответствии с рекомендациями.

3. Определение АТФ – ведут в точном соответствии с рекомендациями.

Количественное определение глюкозы в вытяжке мышечной ткани по методу Бертрана.

В коническую колбу помещают 20 см^3 вытяжки, добавляют по 20 см^3 реактивов А и Б, ставят полученную смесь на электроплитку (на асбест), нагревают до кипения и кипятят 3 мин. Выпадает красный осадок закиси меди. Жидкость над осадком должна иметь синий цвет; если она бесцветна, нужно взять меньший объем вытяжки – 10 или 15 см^3 , доведя объем до 20 мл^3 дистиллированной водой.

Колбу Бунзена со стеклянным фильтром закрепляют при помощи лапок штатива и присоединяют к масляному насосу. Покрывают фильтр слоем асбеста толщиной 1–1,5 мм, для чего разводят порошковый асбест в горячей воде, выливают на фильтр и отфильтровывают при разрежении.

Сливают жидкость над осадком Cu_2O декантацией (не взбалтывая) по стеклянной палочке на стеклянный фильтр и осторожно отсасывают (не досуха, чтобы осадок, попавший на стеклянный фильтр,

не окислялся). Затем осадок в колбе и на фильтре несколько раз промывают горячей дистиллированной водой до полного обеспечения промывных вод, стекающих с фильтра.

Колбу отделяют от фильтра, тщательно ее промывают вначале водопроводной водой, а затем дистиллированной, вставляют пробку с фильтром. Осадок в колбе и на фильтре растворяют сернокислым железом в серной кислоте, добавляя его каждый раз небольшими порциями и отсасывая насосом. После растворения осадка колбу и фильтр промывают холодной дистиллированной водой до отсутствия кислой реакции в промывных водах. Содержимое колбы титруют раствором перманганата калия до слабо-розового окрашивания.

Массовую долю глюкозы (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{nV \cdot 100}{V_1 m \cdot 1000}, \quad (1)$$

где n – количество глюкозы во взятой вытяжке, мг;

V – объем всей вытяжки, см³;

V_1 – объем взятой для определения вытяжки, см³;

m – навеска, г.

Пример расчета. При определении глюкозы в 20 см³ экстракта на титрование израсходовано 15 см³ раствора перманганата калия молярной концентрацией 0,1 моль/дм³. Масса меди составляет $6,36 \cdot 15 = 954$ мг.

По табл. 6.1 (приведена в прил. к гл. III, лаб. раб. № 1) эта масса меди соответствует 50 мг глюкозы, следовательно, содержание глюкозы в исследуемом растворе 250 мг %.

Оформление результатов

Полученные экспериментальные данные представляют в виде таблицы:

Наименование и характеристика образца мышечной ткани	рН	Содержание, мг %			
		гликогена	молочной кислоты	глюкозы	АТФ

По совокупности показателей делают выводы и формулируют заключение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 АНАЛИЗ РАБОТЫ КАТЕПСИНОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Цель и задачи работы: освоить методику определения протеолитической активности катепсинов мышечной ткани убойных животных. В задачи работы входит получение экстракта катепсинов из мышечной ткани и определение протеолитической активности фотометрическим методом в различных условиях реакции.

Методические указания

Рекомендуется использовать мышечную ткань на разных стадиях автолиза. При изучении влияния температуры на активность катепсинов субстраты (растворы стандартных белков) прогревают до температур соответственно 20, 40, 50, 60 °С.

При изучении влияния рН на ферментативную активность мышечного экстракта субстрат растворяют и доводят рН раствором HCl молярной концентрацией 0,3 моль/дм³ до 3,0; 4,0; 5,0; 6,0. Для определения активности протеиназ используют метод Ансона в модификации Е. Каверзневой, в котором о каталитических свойствах судят по степени расщепления стандартных белков с образованием низкомолекулярных продуктов: пептидов и аминокислот, в частности, по накоплению тирозина.

За единицу протеолитической активности (ПА) принято количество фермента, которое за одну минуту при 30 °С катализирует переход в неосаждаемое ТХУ состояние такого количества субстрата, которое содержит 1 мкмоль тирозина (1,181 мг).

Протеолитическая активность экстракта катепсинов (ПА) выражается числом протеолитических единиц в 1 см³ ферментного раствора (ед./см³).

Метод определения протеолитической активности, приведенный в данной работе успешно может быть применен и при анализе пищеварительных ферментов: пепсина, панкреатина, химотрипсина и трипсина.

Объект исследования: мышечная ткань одного или разных видов животных (говядины, свинины, баранины), содержащая комплекс ферментов.

Материалы, реактивы, оборудование: дистиллированная вода; бумажные фильтры; водяные бани и термостаты; раствор казеината натрия или гемоглобина с массовой долей 2 % с рН 3; 4; 5; 6; раствор ТХУ с массовой долей 2 %; раствор карбоната натрия молярной концентрацией 0,5 моль/дм³; рабочий раствор реактива Фолина; фото-электроколориметр.

Подготовка проб

Мышечную ткань очищают от жировой и соединительной ткани, измельчают сначала на мясорубке, а затем гомогенизируют. Навеску измельченного сырья смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1 : 20 и экстрагируют при (20 ± 5) °С при периодическом перемешивании смеси в течение 30 мин. Затем смесь фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат используют в качестве вытяжки протеолитических ферментов – катепсинов.

Ход работы

Субстрат (раствор казеината натрия или гемоглобина с массовой долей 2 % с заданным значением рН) объемом 2 см³ помещают в пробирку, прогревают до нужной температуры (в соответствии с конкретным заданием) и прибавляют 2 см³ исследуемого экстракта протеолитических ферментов мышечной ткани (время внесения фиксируют). Смесь выдерживают в течение 15 мин, а затем прибавляют 4 см³ раствора с массовой долей ТХУ 2 %, встряхивают и выдерживают 20 мин (количество вносимого фермента рассчитывают так, чтобы в смеси присутствовал избыток субстрата).

Параллельно с опытной готовят контрольную пробу, смешивая реактивы в обратной последовательности. Для этого в контрольную пробирку помещают 2 см³ ферментной вытяжки, прибавляют 4 см³ раствора ТХУ с массовой долей 2 %, встряхивают и выдерживают 15 мин. Затем прибавляют 2 см³ субстрата, встряхивают и выдерживают 20 мин при заданной температуре.

Реакционные среды (контроль и опыт) фильтруют через бумажный фильтр. В чистые сухие пробирки отбирают по 1 см³ прозрачного фильтрата и прибавляют 5 см³ раствора Na₂CO₃ молярной концентрацией 0,5 моль/дм³ и 1 см³ рабочего раствора реактива Фолина. Смесь встряхивают и выдерживают 20 мин. После этого окрашенный

раствор фотоколориметруют против контроля при длине волны $\lambda = 670$ нм с красным светофильтром (№ 9), в кюветах с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм.

Протеолитическая активность (ПА, ед./см³)

$$ПА = (4D \cdot K) / (T \cdot \Theta \cdot T), \quad (2)$$

где D – оптическая плотность раствора;

K – разведение;

T Θ – тирозиновый эквивалент, определяемый по калибровочному графику для данного реактива Фолина;

T – продолжительность гидролиза, мин; T=15 мин.

Оформление результатов

Экспериментальные данные оформляют в таблице вида:

Наименование изучаемого объекта	Протеолитическая активность катепсинов		Условия реакции	
	D	ПА, ед./см ³	pH	температура, °C

По полученным данным строят графические зависимости активности катепсинов $f(A)$, где A – исследуемый фактор.

После построения графиков студенты самостоятельно описывают полученные результаты, делают выводы и формулируют заключение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в анализе компонентов свертывающей системы крови. В задачи работы входит изучение действия ионов кальция на свертываемость крови и ее фракций и количественное определение содержания тромбина.

В технологической практике весьма важно не допустить свертывание крови, так как она является весьма ценным сырьевым источником в получении продуктов пищевого, лечебно-профилактического и медицинского значения. В связи с этим определение факторов свертывания, улучшение механизмом их действия лежит в основе разработки новых подходов глубокой переработки крови. Одним из главных компонентов свертывающей системы является тромбин и кальций. Действие первого связано с гидролизом фибриногена, а другой участвует практически на всех стадиях биохимических превращений, активируя ферментные системы.

Появление тромбина в среде свидетельствует о начале развития завершающей стадии свертывания крови. Немаловажная информация связана с установлением действия кальция на белки свертывающей системы.

Методические указания

Свертывание крови включает эффективно регулирующую серию превращений неактивных зимогенов в активные ферменты, ведущую в конечном итоге к образованию тромбина и затем фибрина. Протеолиз фибриногена тромбином с образованием нерастворимого фибрина – заключительная стадия механизма свертывания.

На практике часто используют различные приемы для предотвращения свертывания крови, которое сводится к исключению одного из факторов системы свертывания.

При промышленной переработке крови широко применяют стабилизаторы, действие которых выводит Ca^{2+} из системы свертывания. В качестве стабилизаторов используют оксалаты, цитраты, фосфаты, сульфаты и др. При действии этих реагентов образуются нерастворимые кальциевые соли.

Немаловажное значение имеет количество образовавшегося тромбина, так как именно он осуществляет переход фибриногена в фибрин с образованием сгустка.

Объекты исследования: стабилизированная кровь различных видов животных, получаемая в условиях производства; плазма и сыворотка крови, которые выделяют в лабораторных условиях (или используют фракции при промышленной переработке крови убойных животных).

Материалы реактивы, оборудование: раствор хлорида кальция с массовой долей 3 %, раствор хлорида натрия с массовой долей 0,85 %, штатив с пробирками, химический стакан вместимостью 200–400 см³, стеклянные палочки, пипетки вместимостью 1, 5 и 10 см³, настольная центрифуга, термостат, холодильник, водяная баня.

Подготовка проб

Стабилизированную кровь животных хранят в холодильнике и используют для получения фракций.

Для получения плазмы в лабораторных условиях стабилизированную кровь животных (50 см³) центрифугируют в течение 5–8 мин при 25–42 с⁻¹. Плазму (надосадочную жидкость) осторожно отбирают пипеткой и переносят в чистую сухую пробирку.

Для получения сыворотки нестабилизированную (или дестабилизированную добавлением раствора хлорида кальция с массовой долей 3 %) кровь объемом 150–200 см³ помещают в химический стакан и ставят на 1 ч в термостат при 37 °С, затем переносят на холод.

Для лучшего отделения сгустка крови от сыворотки обводят сгусток по краям стакана стеклянной палочкой. Через 4–5 ч стояния на холоде сыворотка в виде прозрачной жидкости отделяется от кровавого сгустка. Отстоявшуюся сыворотку осторожно отбирают пипеткой.

Кровь, плазму и сыворотку используют для анализа.

Ход работы

1. Действие кальция на свертывающую систему крови и ее фракций

Готовят 6 пробирок для крови каждого вида животных. В одну пробирку помещают 2–3 см³ стабилизированной крови, в другую – также 2–3 см³ стабилизированной крови и добавляют 5–6 капель раствора с массовой долей хлорида кальция 3 %, в третью – 5–6 см³ плазмы, в четвертую – 5–6 см³ плазмы и 5–6 капель раствора хлорида кальция, в пятую – 5–6 см³ сыворотки крови, в шестую – 5–6 см³ сыворотки крови и 5–6 капель раствора хлорида кальция. Пробирки слегка встряхивают и ставят на водяную баню при 37 °С. Через 10–15 мин их вынимают и отмечают, где произошло свертывание.

Оформление результатов

Номер пробирки	Субстрат	Условия опыта	Результат

Заключение студенты формулируют самостоятельно.

2. Определение тромбина

В качестве источника тромбина используют свежую сыворотку крови, из которой готовят ряд разведений. В качестве источника фибриногена используют свежую плазму крови, предварительно нагретую до температуры 50...60 °С с последующей инкубацией в течение 30 мин. За единицу активности тромбина принимают минимальный объем тромбина (см³), который вызывает свертывание.

Готовят 11 пробирок для крови животных. Во все пробирки, кроме первой, помещают по 1 см³ раствора хлорида натрия с массовой долей 0,85 %. В первую и вторую пробирки добавляют по 1 см³ неразбавленной сыворотки (раствор тромбина). Содержимое второй пробирки тщательно перемешивают, 1 см³ смеси из второй пробирки переносят в третью. Содержимое третьей пробирки также перемешивают и 1 см³ смеси переносят в четвертую пробирку и так далее до десятой пробирки, из которой 1 см³ жидкости удаляют. Одиннадцатая пробирка содержит 1 см³ раствора NaCl и служит контролем.

Во все 11 пробирок добавляют по 2 см³ плазмы, предварительно инактивированной и разведенной в 10 раз раствором с массовой долей NaCl 0,85 % (раствор фибрина). Штатив с пробирками помещают в холодильник на 24 ч.

По истечении времени, осторожно наклоня пробирки, определяют, в каких пробирках произошло свертывание. Количество тромбина (X, ед.) вычисляют в той пробирке, где образовался еле заметный сгусток.

Количество тромбина (X, ед.) рассчитывают по формуле:

$$X=1/V, \quad (3)$$

где V – объем тромбина сыворотки крови в пробирке с минимальным образованием сгустка, см³.

Пример расчета. Образование сгустка зафиксировано в первых восьми пробирках. В девятой и последующих пробирках свертывания не произошло. В восьмой пробирке объем сыворотки составляет 0,0078 см³:

объему сыворотки 0,0078 см³ соответствует 1 ед. тромбина,
 объему сыворотки 1 см³ – X ед. тромбина.

$$X = 1/0,0078 = 128 \text{ ед.}$$

В норме 1 см³ сыворотки содержит 62,5–250,0 ед. тромбина.

Оформление результатов

Студенты заносят экспериментальные данные в таблицу рекомендуемой формы:

Показатели	Номер пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Объем тромбина в пробирке										
Кол-во тромбина										
Осадок фибрина (+, –)	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА

Цель и задачи работы: приобрести практический навык в получении и анализе пепсина. В задачи работы входит получение пепсинового экстракта слизистой оболочки желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота и определение молокосвертывающей активности (МСА).

Методические указания

Пепсин – пищеварительный фермент, гидролизующий белки, и проявляющий максимум активности при рН 2–4. Субстратная специфичность фермента проявляется в сродстве к разрыву пептидных связей, образованных гидрофобными радикалами.

Пепсин находит широкое применение при лечении желудочных заболеваний. Технические препараты пепсинов широко используют в пищевой технологии. Самый большой спрос находят пепсиновые препараты при получении творога, творожных масс и различных видов сыров в молочной промышленности, благодаря свойству специфически гидролизовать казеины молока, вызывая их коагуляцию.

При гидролизе пептидов пепсин проявляет высокую специфичность, имея ярко выраженное сродство к гидролизу пептидных связей, образованных карбоксильной группой фенилаланина и аминогруппой другой ароматической аминокислоты. При гидролизе белков фермент проявляет более широкую специфичность за счет функционирования в активном центре «первичных» и «вторичных» участков связывания субстрата. Он расщепляет пептидные связи, образованные тирозином, фенилаланином, триптофаном, а также лизином, гидролизует сложноэфирные связи. Продуктами гидролиза являются в основном пептиды и незначительная доля аминокислот. Он активно свертывает казеин молока, в связи с чем широко применяется в технологии белковых продуктов, вызывая коагуляцию белков молока.

Производство препарата пищевого пепсина включает: измельчение сырья (слизистой оболочки желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота), экстрагирование и активацию фермента (рН 2,0), отделение экстракта от твердого остатка, высаливание или оса-

ждение фермента, сушку, измельчение, обезжиривание, просеивание, стандартизацию по активности.

Определение молокосвертывающей активности препаратов лежит в основе их стандартизации и расчета дозировки при получении продуктов с заданными свойствами. Методика состоит в фиксации по секундомеру промежутка времени от внесения препарата в субстрат (молоко) до начала коагуляции казеина при проведении ферментативной реакции в стандартных условиях.

Объект исследования: свежая, высушенная или замороженная слизистая оболочка желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота.

Материалы, реактивы, оборудование: слизистая оболочка желудка, соляная кислота, бумажные фильтры, молоко натуральное обезжиренное, секундомер; фарфоровая ступка; стаканы или колбы вместимостью 100–250 см³.

Подготовка проб

Слизистую оболочку желудков свиней или сычугов крупного рогатого скота измельчают, настаивают со слабым раствором кислоты (раствор HCl концентрацией 0,01 моль/дм³) в соотношении 1 : 20 в течении 30 мин. Смесь фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат используют в качестве пепсинового экстракта.

Ход работы

100 см³ свежего обезжиренного натурального молока подогревают до 35 °С и прибавляют 1 см³ ферментной вытяжки слизистой желудка, фиксируя время внесения по секундомеру. Через 1–2 мин стеклянной палочкой периодически проверяют начало образования сгустка белков, которое также фиксируют по секундомеру.

Молокосвертывающая активность (МСА, ед./см³) рассчитывается по формуле:

$$\text{МСА} = 2400 \cdot 100 / (\tau \cdot v), \quad (4)$$

где τ – время образования сгустка в молоке, с;
 v – объем ферментов вытяжки, см³.

Рекомендуется измерять температуру молока в диапазоне 30...55 °С, рН 5,5÷7,5.

Оформление результатов

Студенты делают расчеты и представляет отчет по выполнению всех операций, формулируют заключение на основе построения графиков зависимостей: $MCA = f(pH)$ и $MCA = f(t \text{ } ^\circ C)$.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Цель и задачи работы: освоить методы получения и определения гормона инсулина. В задачи работы входит получение экстракта инсулина; проведение качественного и количественного анализа экстракта.

Методические указания

В клинико-биохимических исследованиях применяются методы качественного и количественного определения гормонов, отклонения в содержании гормонов используют для диагностики заболеваний.

Среди гормонов, синтезируемых поджелудочной железой, наиболее важное значение имеют инсулин и глюкагон. Являясь веществом белковой природы, инсулин реагирует с образованием специфически окрашенных веществ, которые служат качественными реакциями и могут быть использованы для обнаружения его в экстрактах.

Количественное определение инсулина осуществляется химическим, так называемым фибриллярным методом. Сущность его состоит в том, что при нагревании инсулина в кислом растворе при 100 °С образуется тиксотропный гель, обладающий сильным двойным лучепреломлением. Путем нагревания в кислой среде при 100 °С и последующего охлаждения до минус 80 °С получается устойчивая фибриллярная модификация инсулина в растворе. Кристаллизующийся продукт, регенерированный из фибрилл, не отличается от исходного инсулина по физическим, химическим и биологическим свойствам.

Метод определения активности инсулина *in vitro* основан на специфической реакции удлинения инсулиновых фибрилл за счет нативного инсулина и определении их массы.

Принцип метода сводится к получению стандартного фибриллярного инсулина, который готовят из кристаллического инсулина активностью 24–25 и. е. в 1 мг. Заготовленный фибриллярный инсулин используют в качестве затравки при определении нативного инсулина.

Испытуемые растворы инсулина после затравки выдерживают в течение 24 ч при 48 °С. За этот срок инсулин осаждается, принимая фибриллярную форму.

Фибриллы отделяют от раствора центрифугированием, затем промывают различными растворителями на центрифуге для очистки инсулина от балластных белков и примесей. Полученный осадок высушивают над пятиокисью фосфора и взвешивают или производят спектрофотометрическое определение суспензии инсулина.

Масса инсулина за вычетом массы добавленного для затравки фибриллярного инсулина соответствует содержанию инсулина в испытуемом растворе активностью 24 и. е. в 1 мг.

При определении спектрофотометрическим методом небольших количеств инсулина получают более точные результаты, чем при гравиметрическом определении.

Объект исследования: свежая или замороженная поджелудочная железа крупного рогатого скота или свиней.

Материалы, реактивы, оборудование: 1 весы технические; подкисленный этиловый спирт; бумажный фильтр; концентрированная азотная кислота; раствор гидроксида натрия с массовой долей 10 %; раствор с массовой долей сульфата меди 1 %; реактив Фоля; реактив Миллона. 2. растворы с объемной долей этилового спирта 63, 80, 95 %; серная кислота; вибрационный аппарат; марля; центрифуга лабораторная; центрифужные стаканы; кристаллический инсулин с активностью 24 и. е.; стеклянные палочки; стеклянный капилляр; резиновая трубка; сосуд, соединенный с водоструйным насосом; растворы соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 и 1 моль/дм³; метиловый спирт; спектрофотометр; шприц; ампула из молибденового стекла; гомогенизатор; термос; сухой лед.

Подготовка проб

1. Свежую или замороженную поджелудочную железу тщательно измельчают и готовят экстракт путем смешивания с подкисленным этиловым спиртом на холоде в соотношении 1 : 10 в течение 10 мин. Для проведения качественных реакций на инсулин используют фильтрованный экстракт поджелудочной железы.

2. Для количественного анализа инсулина 200 г измельченной поджелудочной железы заливают раствором этилового спирта с объ-

емной долей 80 %, подкисленным серной кислотой до рН 2, в соотношении 1 : 2, смесь перемешивают и экстрагируют в течение 3 ч на вибрационном аппарате, контролируя рН через каждый час экстракции.

Полученную массу колируют через два слоя марли, осадок отжимают. Раствор тотчас помещают в центрифужные стаканы вместимостью 200 см³ и центрифугируют в течение 30 мин при 42–50 с⁻¹. Если центрифугат недостаточно прозрачен, его центрифугируют вторично.

Ход работы

1. Качественные реакции на инсулин

Для проведения реакции Геллера к 1 см³ концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей фиксируют образование белого аморфного осадка в виде небольшого кольца.

Для проведения биуретовой реакции к 1 см³ раствора инсулина добавляют 0,5 см³ раствора гидроксида натрия с массовой долей 10 % и 0,1 см³ раствора сульфата меди с массовой долей 1 %. Фиксируют изменение окраски.

Для проведения реакции Фоля к 0,5 см³ раствора инсулина добавляют 0,5 см³ реактива Фоля и кипятят смесь. Через 1-2 мин термической обработки фиксируют появление бурого или черного осадка сернистого свинца.

Для проведения реакции Миллона к 1 см³ раствора инсулина добавляют 2–3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Фиксируют красное окрашивание раствора белка или появление белого осадка белка, который при нагревании приобретает красную окраску.

Оформление результатов

Наблюдения за проведением качественных реакций на инсулин студенты аккуратно и точно фиксируют в тетради (описывают условия и эффект реакций), формулируют выводы. Результаты исследований рекомендуется оформить в таблице вида:

Название и механизм качественной реакции	Употребляемые реактивы, условия реакций	Эффект реакций

2. Количественное определение инсулина

После окончания центрифугирования раствор сливают, измеряют его объем и переносят 150 см^3 в центрифужный стакан, в который добавляют $2,2 \text{ см}^3$ стандартного раствора фибриллярного инсулина, содержащего 4 мг инсулина активностью 24 и. с. Раствор тщательно перемешивают стеклянной палочкой, которую оставляют в центрифужном стакане, и помещают на 24 ч в термостат с температурой $48 \text{ }^\circ\text{C}$. Затем образовавшийся осадок центрифугируют в течение 45 мин (при 16 с^{-1} – 20 мин и при $3,3 \text{ с}^{-1}$ – 25 мин).

Прозрачный раствор из центрифужного стакана осторожно, не захватывая осадка, отбирают стеклянным капилляром, соединенным резиновой трубкой с сосудом, в котором водоструйным насосом создан небольшой вакуум.

Полученный осадок инсулина для освобождения от балластных белков промывают с последующим центрифугированием четырьмя растворами: первый – смесь 99 см^3 раствора с объемной долей этилового спирта 63% , 1 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3 и 1 г хлорида аммония (3 раза по 5 см^3); второй – смесь 99 см^3 раствора с объемной долей этилового спирта 65% , и 1 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3 (1 раз 5 см^3); третий – абсолютный ацетон (2 раза по 5 см^3); четвертый – 100 см^3 метилового спирта и 1 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм^3 (2 раза по 5 см^3).

Промывают осадок в центрифужных пробирках вместимостью $15\text{--}20 \text{ см}^3$. Для этого осадок из центрифужного стакана после тщательного перемешивания стеклянной палочкой с 5 см^3 промывной смеси (первый раствор) количественно переносят в центрифужную пробирку. Центрифужный стакан с палочкой смывают 5 см^3 промывного раствора и используют этот раствор для промывки осадка в центрифужной пробирке после центрифугирования и отбора прозрачной надосадочной жидкости. Осадок промывают всеми четырьмя растворами, внимательно следя за сохранностью осадка и полнотой его переноса из центрифужного стакана. При промывке растворами центрифугирование проводят в течение $7\text{--}8 \text{ мин}$ при 25 с^{-1} .

Для спектрофотометрических измерений полученный осадок после последней промывки подкисленным метиловым спиртом центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость и тщательно перемешивают с 5 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/дм³, содержащей 0,1 % хлорида аммония.

Оптическую плотность полученной суспензии измеряют в ультрафиолетовой области спектра. Спектрофотометрические измерения суспензии производят на спектрофотометре при длине волны 275 нм по отношению к растворителю (раствор соляной кислоты молярной концентрацией 0,05 моль/дм³ с 0,1 % хлористого аммония), толщина слоя 0,2 мм (кювета с вкладышем). По оптической плотности определяют с помощью калибровочного графика содержание инсулина и затем производят расчет на 100 г поджелудочной железы.

Оформление результатов

Строят калибровочный график по величинам оптической плотности суспензий, содержащих известное количество фибриллярного инсулина; фиксируют результаты количественного определения инсулина в экстрактах поджелудочной железы крупного рогатого скота, свиней в мг на 100 г сырой ткани из расчета активности инсулина 24 и. е. в 1 мг; самостоятельно формулируют заключение по работе с учетом полученных данных по качественным реакциям на инсулин.

ДЛЯ ЗАПИСЕЙ

ДЛЯ ЗАПИСЕЙ

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
ИЗ ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ
(Часть 1)**

Методические указания

Составители: **Забашта** Николай Николаевич,
Нестеренко Антон Алексеевич

Подписано в печать 04.12.2019. Формат 60 × 84 ¹/₁₆.

Усл. печ. л. – 2,6. Уч.-изд. л. – 2,0.

Тираж 30 экз. Заказ №

Типография Кубанского государственного аграрного университета.
350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13

