

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ БЕЛКОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА

Представлен анализ белковых веществ биологических объектов и молочных продуктов многокомпонентного состава. Определены массовая доля водо-, соле- и щелочерастворимых белковых фракций, а также содержание общего белка в анализируемых образцах. Проведено исследование электрофоретического разделения белковых фракций проб животного происхождения и многокомпонентных составов на их основе.

Ключевые слова: белки, выделение, биологические объекты, молочные продукты, электрофоретическое разделение.

A. Yu. Prosekov, A. V. Pozdnyakova

THE RESEARCH OF THE COMPOSITION AND PROPERTIES OF THE ANIMAL ORIGIN PROTEINS OF BIOLOGICAL OBJECTS AND MULTICOMPONENT DAIRY PRODUCTS

The analysis of the protein substances of biological objects and multicomponent dairy products is presented. Mass fraction of water-, salt-, alkali-soluble protein fractions and crude protein content in assayed specimens are detected. The investigation of electrophoretic separation of protein fractions of animal origin samples and multicomponent compositions on its basis is conducted.

Key words: proteins, extraction, biological objects, dairy products, electrophoretic separation.

Введение. В последние годы обнаружена группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением различных отделов нервной системы и имеющих необычный генетический механизм возникновения и развития [1]. Долгое время считалось, что клинические симптомы этих болезней возникают при попадании в организм инфекционного агента, имеющего антигенное сродство к нервным клеткам. Вскоре стало ясно, что основная патогенетическая роль в развитии этих заболеваний принадлежит белковому агенту, который было предложено называть прионом (PRION – от англ. Proteinaceous Infectious particle, с перестановкой двух букв). Прионы – особый класс не содержащих нуклеиновых кислот (чисто белковых) инфекционных агентов, вызывающих тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных (т. н. «медленные инфекции») [3]. В группу прионных болезней входят куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), болезнь Герстмана-Штротслера и летальная семейная инсомния [2].

К настоящему времени установлено 18 различных мутаций человеческого гена прион-протеина, которые связаны с различными прионовыми болезнями. В отличие от всех известных инфекционных агентов, инфекционный прионный белок не синтезируется заново, а накапливается исключительно за счет превращения нормального клеточного белка в инфекционный. В организм человека они попадают через продукты питания, коих в рационе великое множество, это животная пища любого вида: молоко, мясо, жиры, колбасы, масло и т.д. Процесс происходит относительно медленно – болезнь развивается в течение нескольких лет, но неотвратимо приводит к гибели животного или человека [4].

Таким образом, контроль качества сырья животного происхождения, используемого для производства пищевых продуктов и медицинских, а именно анализ белковых веществ, имеет важное теоретическое и большое прикладное значение, так как позволяет исключить проникновение инфекционного прионного агента в организм человека.

Цель исследования. Изучение состава и свойств белков животного происхождения биологических объектов и молочных продуктов многокомпонентного состава.

Объекты и методы исследования. Белки мяса и мясопродуктов можно разделить на растворимые в воде (белки саркоплазмы), в солевых растворах (белки миофибрил) и нерастворимые в водно-солевых растворах, условно называемые белками стромы. Водорастворимые белки саркоплазмы включают миоген, миоглобин, миоальбумин, глобулин X. К солерастворимым белкам относятся миозин, актин, тропомиозин, тропониновый комплекс. Фракция стромы включает белки, входящие в состав сарколеммы и внутримышечной соединительной ткани, а также белки ядер. Фракция стромы объединяет белки: коллаген, эластин, рети-

лулин, а также гликопротеиды-муцины и мукоиды. На практике их часто называют щелочерастворимой белковой фракцией мышечной ткани.

В качестве объектов исследования были использованы мясо, кровь, продукты переработки крови, желатин, молоко, сыр. Образцы для исследования отбирались у туш крупного рогатого скота, прошедших ветеринарный контроль и допущенных к употреблению в пищу человеком; образцы мяса – после процедуры нутровки туши крупного рогатого скота и разделения туши на две продольные полутуши из подлопаточной области; образцы крови – на стадии обескровливания туши.

Для выделения различных фракций белков животного происхождения проводили предварительную подготовку материала.

Для проведения цветной реакции к 1 см³ исследуемых растворов белков (фракции: водорастворимая, солерастворимая и щелочерастворимая) добавляли 4 см³ биуретового реактива. Смесь оставляли в покое при температуре 20±5°С в течение 30 минут. По истечении времени образования окрашенного комплекса измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540–560 мкм на спектрофотометре.

Подготовив образцы тканей крупного рогатого скота и животных продуктов, проведя фракционирование, измерив оптическую плотность, выполнили расчеты по определению количества общего белка в различных фракциях. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание белков в различных фракциях

Образец	Содержание белков						Всего	
	водорастворимых		солерастворимых		щелочерастворимых		мг/г	%
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%		
Говядина нежирная	648,32	6,48	811,41	8,11	324,28	3,24	1784,01	17,83

Таким образом, установлено, что в пробах мяса среднее содержание водорастворимых белков составляет 6,48 %; солерастворимых – 8,11; щелочерастворимых – 3,24 %. Полученные данные хорошо коррелируют с литературными данными, а следовательно, выбранный метод фракционирования белков мяса соответствует предъявляемым требованиям.

Также провели определение содержания различных фракций белков на элементном анализаторе азота (модель «Rapid N cube»), предназначенного для автоматического определения содержания азота (протеинов) в пищевых, сельскохозяйственных продуктах, зерне, в различных агрегатных состояниях: твердых, жидких, пастообразных.

Определение содержания общего белка в пробах проводили по методике выполнения измерений массовой доли общего и белкового азота в мясе, мясных продуктах и белоксодержащих пищевых продуктах методом сжигания по Дюма. Метод основан на высокотемпературном сжигании пробы в токе газа-носителя СО₂ с дозированием кислорода. Для составления объединенной пробы точечные пробы соединяли, дважды измельчали на бытовой или электрической мясорубке и тщательно перемешивали. Объединенную пробу помещали в стеклянную или пластмассовую банку вместимостью 200–400 см³ и хранили при температуре 4±2°С до окончания измерений.

Образец перед началом анализа взвешивали, и показатели его массы передавали (автоматически или вручную) в базу данных управляющей программы. Результат взвешивания регистрировали до 0,1 мг. По абсолютному содержанию азота в пробе и массе пробы рассчитывали (автоматически) массовую долю азота.

Далее рассчитывали массовую долю белка, используя пересчетные коэффициенты, определенные для каждого вида продукции. За результат измерений принимали среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений.

Образцы для исследования отбирались у туш крупного рогатого скота, прошедших ветеринарный контроль и допущенных к употреблению в пищу человеком. Образцы мяса отбирались после процедуры нутровки туши крупного рогатого скота и разделения туши на две продольные полутуши из подлопаточной области. Образцы крови отбирались на стадии обескровливания туши.

Было проведено исследование содержания общего белка в сыворотке крови, которую получали следующим образом: кровь, полученную без антикоагулянтов, добавляли в центрифужную стеклянную пробирку, давали отстояться в ней при комнатной температуре 15–20°С в течение 30 минут до образования сгустка.

По окончании образования сгустка пробирки открывали и осторожно проводили тонкой стеклянной палочкой по их внутренним стенкам по окружности в верхнем слое крови для отделения столбика сгустка от стенок пробирки. Сыворотку сливали в другую центрифужную пробирку, придерживая сгусток стеклянной палочкой, и центрифугировали. Центрифугирование проводили в микропробирках при скорости вращения ротора 10 000 об/мин в течение 1,5 минут.

Кроме того, было проведено исследование содержания общего белка в цельном молоке, белковом продукте – сыре. На рисунках 1–8 представлены спектры теплопроводности различных образцов.

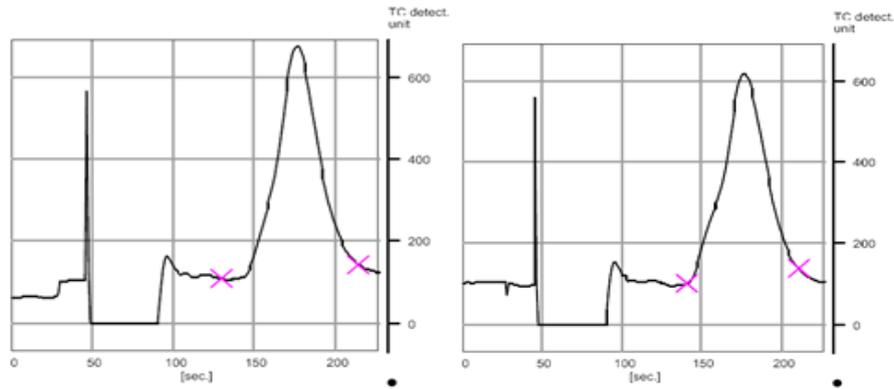


Рис. 1. Спектры теплопроводности образцов молока

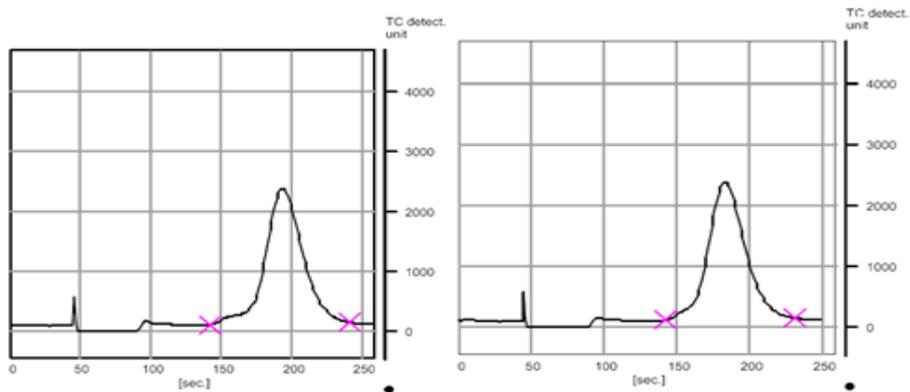


Рис. 2. Спектры теплопроводности образцов сыворотки крови

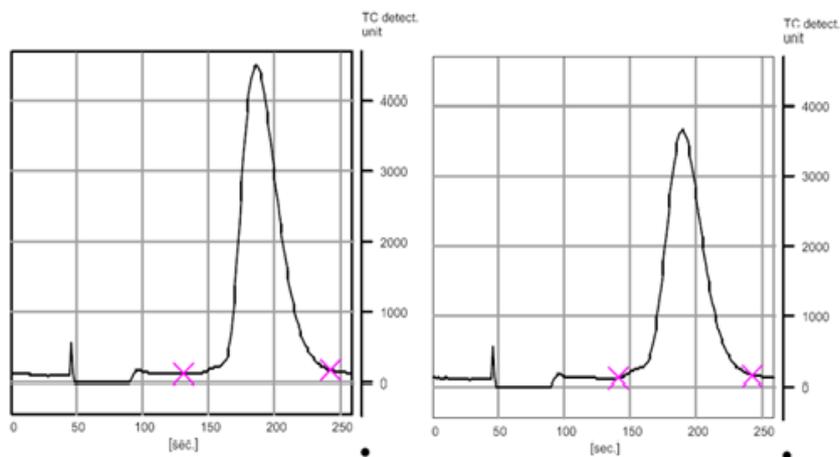


Рис. 3. Спектры теплопроводности образцов цельной крови

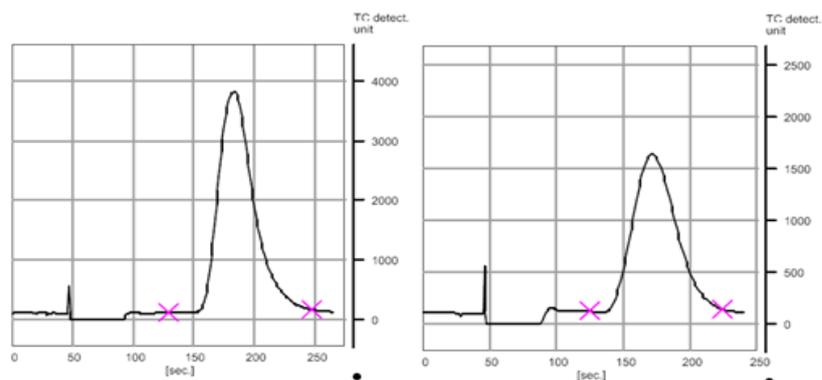


Рис. 4. Спектры теплопроводности образцов сыра

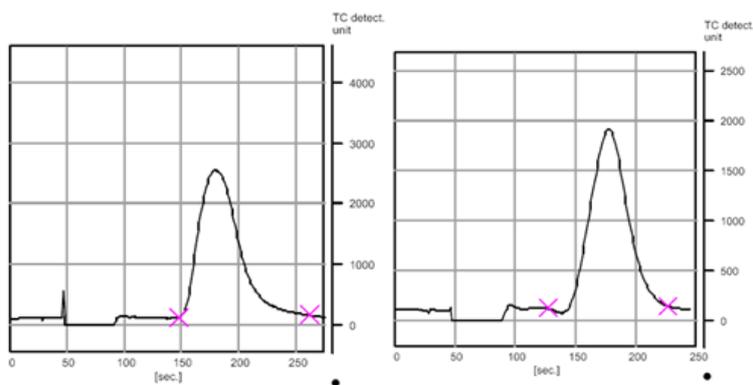


Рис. 5. Спектры теплопроводности образцов мяса

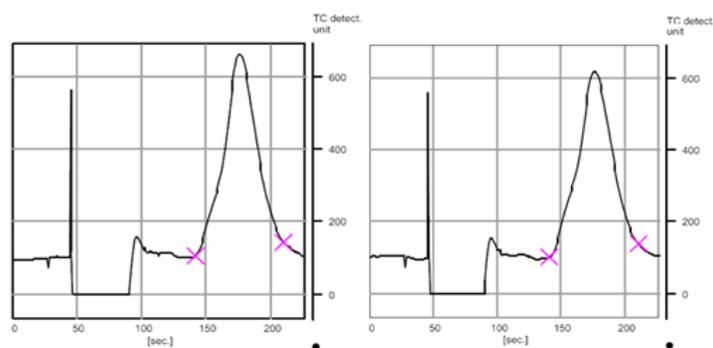


Рис. 6. Спектры теплопроводности водорастворимой фракции мясных белков

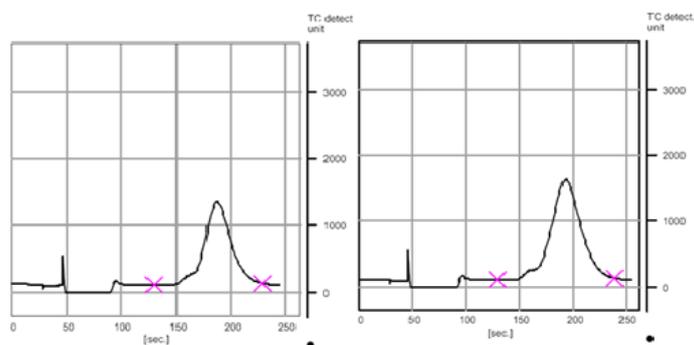


Рис. 7. Спектры теплопроводности солерастворимой фракции мясных белков

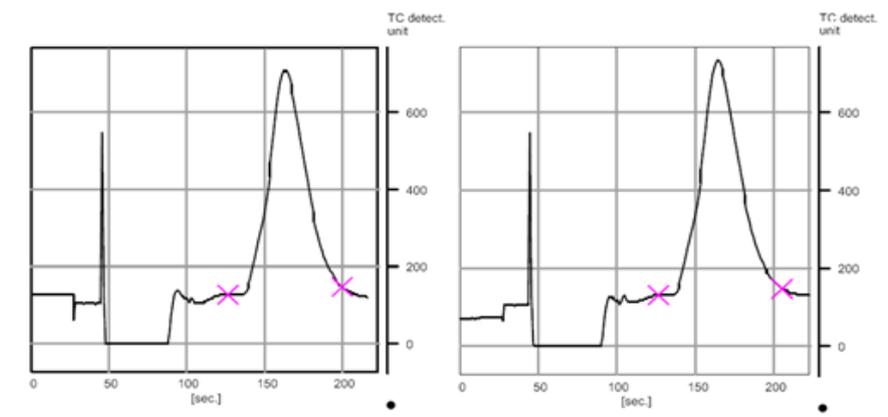


Рис. 8. Спектры теплопроводности фракции стромы мясных белков

Таблица 2

Общее содержание белка в образцах

Объект исследования	Вес, мг	Содержание общего азота, %	Коэффициент пересчета	Общий белок, %	Погрешность измерения, $\pm\delta$, %
Цельное молоко	195,60	0,576	4,64	2,63	0,31
	192,40	0,558			
Сыворотка крови	188,12	2,370	6,25	14,83	0,89
	180,72	2,234			
Кровь цельная	214,50	3,462	6,25	21,97	1,32
	254,80	3,571			
Сыр	189,70	3,328	4,64	15,85	0,95
	229,60	3,506			
Говядина нежирная	126,50	3,222	5,62	18,46	1,11
	110,00	3,347			
Водорастворимые фракции	97,50	0,558	5,62	6,83	0,41
	96,50	0,557			
Солерастворимые фракции	136,30	1,710	05,62	8,78	0,53
	142,25	1,658			
Фракции стромы	186,80	0,675	5,62	3,90	0,23
	171,20	0,679			

Таким образом, содержание общего белка в цельной крови составляет 21,97 г/100г; в сыворотке крови – 14,83; в образцах цельного молока – 2,63; в сыре – 15,85 г/100г. В говядине содержание общего белка составляет 18,46 г/100г, из них водорастворимой фракции – 6,83 г/100 г, солерастворимой – 8,78 г/100 г, фракции стромы – 3,90 г/100 г.

На следующем этапе исследования проводили электрофоретическое разделение белков на вертикальной ячейке PROTEAN II xi (BIORAD, Москва), Молекулярно-массовое распределение белков в объектах оценивали с помощью белкового электрофореза методом Лэмли. Для разделения белка использовали денатурирующий полиакриламидный гель (12% разделяющий и 4% фокусирующий) с 0,1%-м додецилсульфатом натрия. Форез проводили на однократном электродном буфере с добавлением 0,1%-го додецилсульфата натрия при 15 мА. Гель окрашивали 0,2%-м Coomassie Brilliant Blue R250, красителем, приготовленным на ледяной уксусной кислоте, при повышенной температуре в течение 7–10 мин затем трижды отмывали дистиллированной водой.

Просмотр и фотографирование гелей проводили на УФ-трансиллюминаторе TCP-20M («Vilber Lourmat», США). Сохранение и обработку данных осуществляли с помощью гель-документирующей системы «Doc-It LS». Перед началом электрофореза образцы проинкубировали в присутствии додецилсульфата натрия.

Калибровку геля проводили, используя набор белковых маркеров производства SibEnzyme, содержащий двенадцать высокоочищенных рекомбинантных белков молекулярной массы от 10 до 250 кДа, которые после проведения электрофореза в полиакриламидном геле и фиксации Coomassie Brilliant Blue R-250 образуют дискретные полосы. Для количественной оценки содержания фракций белков провели калибровку по белкам сывороточного альбумина человека с известными концентрациями. Аппроксимацию калибровочной зависимости проводили полиномом третьего порядка, при этом коэффициент корреляции равен 1,0.

Пробоподготовку жидких образцов осуществляли разбавлением дистиллированной водой таким образом, чтобы содержание белков в кармашке геля не превышало 5 мкг на 20 мкл раствора. В этом случае удастся добиться наилучшего распределения белковых фракций (рис.9).

Результаты проведения денатурирующего электрофореза во фракциях стромы и солерастворимых белков указывают на то, что там нет легких фракций белков, что вполне соответствует литературным данным, в то время как в водорастворимой фракции содержится сразу две фракции белков размером от 30 до 40 кДа (диапазон размера нормального прионного белка). Относительное содержание белковых фракций массой от 30 до 40 кДа в водорастворимой фракции белков мяса составляет 18,19 % от общего количества, это 1,25 г/100 г мяса.

Условия, которые были подобраны для электрофоретического разделения белков массой от 10 до 250 кДа, не позволяют провести исследования образцов цельной крови. Высокое содержание тяжелого белка-фибриногена блокирует сетку геля для прохождения белками с меньшим размером, поэтому проводили исследование сыворотки крови. Полученные электрофореграммы проб сыворотки крови указывают на наличие сразу фракций белков крови в диапазоне от 30 до 40 кДа. Относительное содержание этих белков в сыворотке крови составляет 22,06 % от общего количества, это 2,15 г/100 г сыворотки крови (табл.3).

Электрофоретическое разделение промышленных образцов желатина, который получают частичным гидролизом коллагена, полученного из костей, шкур и кож, жил и сухожилий крупного рогатого скота, показывает высокую степень очистки продукта. Легкие фракции белков не обнаруживаются.

Анализ электрофореграмм указывает на присутствие традиционных молочных белков во всех образцах. Это казеины, которые имеют молекулярную массу ~ 22-32 кДа, b-лактоглобулин ~ 18 кДа, α-лактальбумин ~ 14 кДа, лактоферрин ~ 80 кДа, сывороточный альбумин ~ 66 кДа. Посторонних белковых фракций массой от 30 до 40 кДа не обнаружено. Отсутствие белковых фракций массой от 30 до 40 кДа в образцах свидетельствует о низкой инфективности исследуемых проб.

Таблица 3

Содержание общего белка и фракционное распределение белков

Наименование образца	Количество образцов, шт.	Общий белок, г/100 г	Количество фракций белков, шт. в диапазоне		
			15-30 кДа	30-40 кДа	40-250 кДа
Водорастворимая фракция	20	6,83	1	2	6
Солерастворимая фракция	20	8,78	0	0	6
Фракции стромы	20	3,90	0	0	2
Сыворотка крови	20	9,73	1	2	8
Желатин	10	84,32	0	0	3
Молоко	20	3,02	6	0	2
Сыр	20	21,57	4	0	1

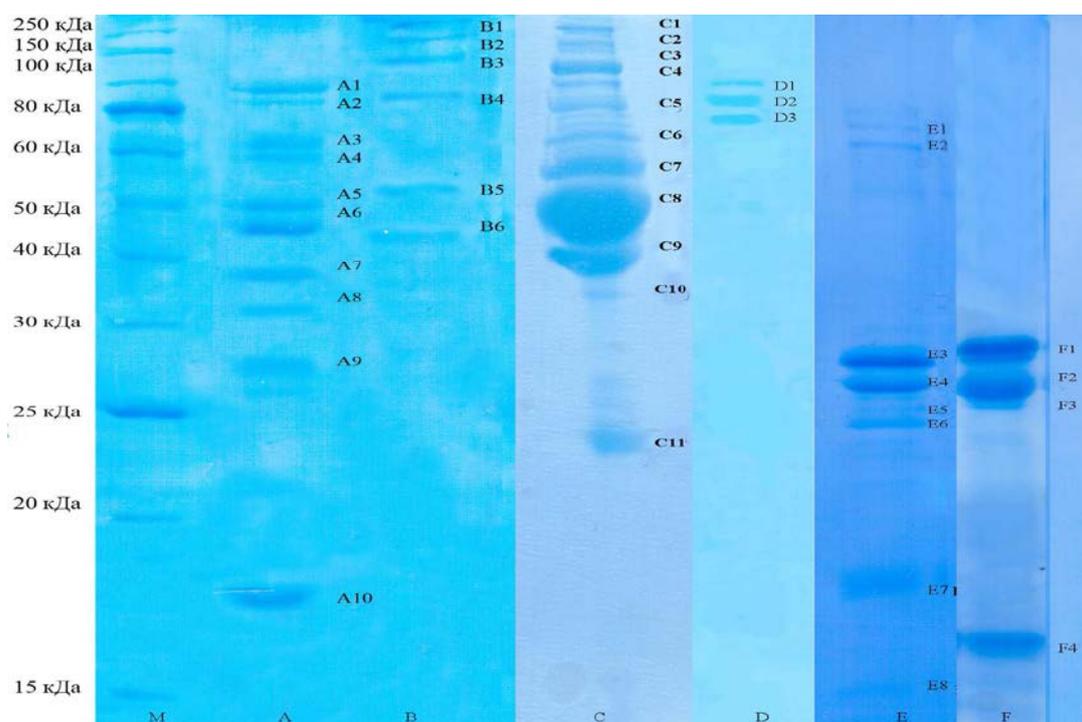


Рис. 9. Электрофорез в полиакриламидном геле (12% разделяющий и 4% фокусирующий): М – маркер; А – водорастворимая фракция белков; В – солерастворимая фракция белков; С – сыворотка крови; D – желатин; Е – молоко; F – сыр

Выводы. Поскольку различные фракции белков, получаемые из туши крупного рогатого скота, используются в различных областях пищевой и фармацевтической промышленности, были проведены работы по выделению этих белков и оценке их содержания в первоначальном сырье. Количественное определение содержания общего белка в говядине составляет 18,46 г/100 г, из них водорастворимой фракции – 6,83 г/100 г, солерастворимой – 8,78 г/100 г, фракции стромы – 3,90 г/100 г. Также были проведены исследования количественного содержания общего белка в различных продуктах переработки животного сырья, а именно: в цельной крови содержание общего белка составляет 21,97 г/100 г; в сыворотке крови – 14,83, в образцах цельного молока – 2,63; в сыре – 15,85 г/100 г. Было проведено исследование электрофоретического разделения белковых фракций в образцах. Отсутствие белковых фракций массой от 30 до 40 кДа в образцах свидетельствует о низкой инфективности (степени заражения) исследуемых проб. Полученные результаты свидетельствуют о том, что водорастворимая фракция белков мяса и сыворотка крови имеют высокую степень инфективности в отношении патогенной формы прионного белка.

Литература

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М.: Мед. информ. агентство, 2005. – 736 с.
2. Григорьев В.Б. Прионные болезни человека и животных // Вопросы вирусологии. – 2004. – Т. 6. – С. 4–12.
3. Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни. – М.: Изд-во РАМН, 2004. – 384 с.
4. Шкундина И.С., Тер-Аванесян М.Д. Прионы // Успехи биол. химии. – 2006. – Т. 46. – С. 3–42.

