

Е.Ю. КАНЮКА, С.Г. ЗИНОВЬЕВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Институт свиноводства и агропромышленного производства
Национальной академии аграрных наук Украины

В статье изложена доработанная методика определения гистидин-содержащих дипептидов (ГСД) для небольшого количества биоматериала (1 грамм сырой мышечной ткани). Показана ориентировочная информационная матрица расчёта содержания ГСД в мышечной ткани. Предлагаемая методика основана на экстракции гистидин-содержащих дипептидов водным раствором хлорной кислоты, осаждением её в виде нерастворимой соли с последующим центрифугированием и получением с помощью диазореактива в супернатанте окрашенного соединения, интенсивность которого прямо зависит от содержания ГСД в исследуемом растворе. Данная методика может быть полезна студентам, аспирантам и научным работникам, занимающимся проблемами биологической ценности и фальсификации мышечной ткани.

Ключевые слова: свиньи, мышечная ткань, гистидин-содержащие дипептиды, методика

E.Y. KANYUKA, S.G. ZINOVIEV

DETERMINATION OF HISTIDINE-CONTAINING DIPEPTIDES IN MUSCLE TISSUE

Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production of the National Academy
of Agrarian Science of Ukraine

The article presents a modified method of determining the histidine-containing dipeptides (HCD) for a small amount of biological material (1 gram of fresh muscle tissue). The approximate calculation matrix of HCD content in muscle tissue is shown. The proposed method is based on the extraction of histidine-containing dipeptide with an aqueous solution of perchloric acid, its precipitation as an insoluble salt, with following centrifugation and obtaining with help of diazoreagent in supernatant of a compound whith intensity directly dependent on the content of HCD in the test solution. This technique can be useful for students, graduate students and researchers dealing with issues of biological value and falsification of muscle tissue.

Key words: pigs, muscle tissue, histidine-containing dipeptides, method

Введение. Среди азотсодержащих компонентов, определяемых в мышечных экстрактах, выделяют комплекс гистидин-содержащих дипептидов (ГСД). В наибольшем количестве в мышечной ткани сельскохозйственных животных указанные соединения представлены карнозином (β -аланил-L-гистидином) и анзерином (Р-аланилметилгистидином) [1].

Немаловажную роль играют указанные дипептиды в живом орга-

низме. Карнозин способен: взаимодействовать с промежуточными продуктами перекисного окисления липидов, снижая образование перекисей; образовывать с супероксид-анионом кислорода комплекс с переносом заряда, снижая его активную концентрацию; эффективно нейтрализовать гидроксид-радикал, что препятствует повреждению мембранных липидов и белков в условиях окислительного стресса. Анзерин тормозит накопление конечного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида. В среде с карнозином и анзеринном максимальный уровень накопления малонового диальдегида понижается на 10-50 % [2, с. 26-41]. Карнозин имеет значительный потенциал действия в качестве природного антиоксиданта [3, 4], учитывая то, что в мышечной ткани его содержится существенно выше, чем таковое содержание витаминов С и Е [2].

Хотим заметить то, что гистидин-содержащие дипептиды найдены исключительно в тканях животных. Установлена тканевая специфичность в размещении и накоплении указанных дипептидов. ГСД принадлежат к такому классу биомаркеров, которые используют для идентификации различных видов мяса. Например, наличие карнозина и анзерина достаточно специфично в мышцах овцы, крупного рогатого скота, лошади, кенгуру, курицы, утки и индейки. Удалось установить фальсификат сырой свинины под говядину, базируясь на данных о гистидин-содержащих дипептидах [5]. Также определялось содержание карнозина в продуктах питания на предмет их животного происхождения [6].

Для человека гистидин-содержащие дипептиды проявляют стимулирующее действие на пищеварительные железы [7, с. 60-99], а также формируют специфический вкус и аромат мяса [1]. Отмечается их высокая сохранность в процессе технологической переработки мясной продукции. Содержание ГСД рекомендуют использовать для оценки качества мясных изделий и определения доли мышечной ткани в колбасном фарше [8].

Целью нашей работы было доработать методику определения гистидин-содержащих дипептидов для небольшого количества биоматериала и создать алгоритм расчёта содержания ГСД в мышечной ткани.

Материал и методика исследований. Суть метода. Поскольку карнозин, как дипептид, содержащий в своем составе молекулу гистидина с имидазольным кольцом, имеет ряд специфических свойств, а именно свойство вступать в реакцию азосоединения и так же, как и чистый гистидин давать специфическую цветную реакцию Паули с образованием хромогена красно-оранжевого цвета.

Предлагаемая нами методика основана на экстракции гистидин-содержащих дипептидов водным раствором хлорной кислоты, осажде-

нием её в виде нерастворимой соли с последующим центрифугированием и получением с помощью диазореактива в супернатанте окрашенного соединения, интенсивность которого прямо зависит от содержания ГСД в исследуемом растворе.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Нами была взята за основу методика «Определение карнозина в безбелковом экстракте по диазореакции» [9].

Приборы и реактивы: весы 4 класса точности, центрифуга на 5000 оборотов/мин, рН-метр, фотоэлектроколоримет КФК-3МП, кюветы 10 мм, фарфоровая ступка с пестиком, колба мерная на 100 мл, мерная пробирка на 10 мл, центрифужные пробирки, крупные сахарные пробирки, лёд, сульфаниловая кислота (ХЧ), HCl концентрированная (ХЧ), HClO_4 молярная концентрация 0,5 моль/дм³ (ХЧ), раствор NaNO_2 свежеприготовленный с массовой долей 5 %, раствор КОН с массовой долей 33 %, раствор Na_2CO_3 с массовой долей 10 %, дистиллированная вода.

Разрешается использовать другую измерительную технику, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы, которые по характеристикам и качеству не отличаются от указанных.

Приготовление реактивов. *Раствор сульфаниловой кислоты.* 0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 см³ концентрированной HCl и доводят объём дистиллированной водой до 100 см³. Необходимо держать на холоде.

Раствор диазотированной сульфаниловой кислоты. В мерную колбу объёмом 100 мл, которая поставлена в ледяную баню, наливают 6 см³ раствора сульфаниловой кислоты, приливают 6 см³ свежеприготовленного раствора NaNO_2 , тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем доливают ещё 24 см³ раствора NaNO_2 массовой долей 5 % и через 5 мин. доводят объём водой до 100 см³. Каждый раз готовят свежий раствор. Срок хранения на льду – 5-6 часов. Считать правильно приготовленный реактив при отсутствии бурого газа при добавлении NaNO_2 .

Перед проведением исследований необходимо выдержать все растворы и исследуемые образцы в холодильнике при температуре +4...+7 °С.

Проведение исследования.

1. Мышечную ткань освободить от жира, соединительной ткани и измельчить, отобрать навеску массой 1 г.

2. Перенести в фарфоровую ступку, добавить 5 мл HClO_4 , тщательно растереть.

3. Перенести в центрифужную пробирку и центрифугировать 20 минут на 5000 об./мин. Надосадочную жидкость слить в центрифуж-

ную пробирку.

4. К осадку добавить и тщательно перемешать 1 мл HClO_4 . Центрифугировать 10 минут при 5000 об./мин. Надосадочную жидкость слить к первой части.

5. К полученной надосадочной жидкости добавлять по каплям КОН, контролируя pH раствора 7,0-8,0 (но не ниже 7,0), при этом выпадает белый осадок нерастворимого калия перхлората (KClO_4).

6. Полученную смесь перенести снова в центрифужные пробирки и центрифугировать 5 минут на 3000 об./мин.

7. Супернатант перелить в большие (сахарные) пробирки. Довести объём до 10 мл дистиллированной водой.

8. Дополнительно приготовить 1 пробирку с холостой пробой – 10 мл дистиллированной воды.

9. Добавить в каждую пробирку по 3 мл диазореактива и оставить на 5 минут.

10. Затем добавить 3 мл Na_2CO_3 и очень быстро поставить кювету в ФЭК и наблюдать за экстинкцией до максимального значения. Измерение проводить против холостой пробы.

Построение калибровочного графика. Расчёт содержания гистидин-содержащих дипептидов проводят по предварительно построенному графику по гистидину. Для этого необходимо растворить в воде 0,0027 г гистидина и довести до объёма 200 мл. Затем в 10 пробирок необходимо добавить вещества в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1 – Состав рабочих растворов гистидина

Объём раствора гистидина, мл	Объём воды, мл	Содержание гистидина, мкг	Содержание гистидина, мкмоль
0,5	9,5	5	0,032
1,0	9,0	10	0,064
1,5	8,5	15	0,097
2,0	8,0	20	0,129
2,5	7,5	25	0,161
3,0	7,0	30	0,193
3,5	6,5	35	0,225
4,0	6,0	40	0,258
4,5	5,5	45	0,290
5,0	5,0	50	0,322

Затем проводят окрашивание раствора по описанной методике. По полученным результатам экстинкции строят график. Ориентировочно рабочий график может выглядеть следующим образом (рисунок 1).

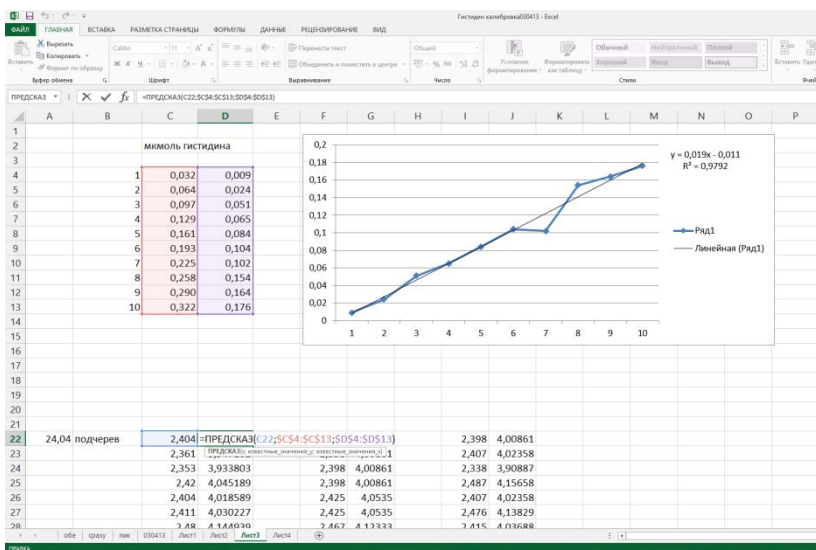


Рисунок 1 – Информационная матрица построения рабочего графика и расчёта содержания ГСД

Расчёты проводят с использованием встроенной в EXCEL функции «ПРЕДСКАЗ». Она вычисляет или предсказывает будущее значение по существующим значениям. Предсказываемое значение – это значение Y, соответствующее заданному значению X. Значения X и Y известны. Новое значение предсказывается с использованием линейной регрессии. Показатель R^2 построенного калибровочного графика должен быть большим или равняться 0,95. В нашем случае, несмотря на то, что одна из «точек» выпала, он равняется 0,9792.

Пример использования описанной функции для расчёта содержания ГСД в подчревной мышце свиней показан на рисунке 1. Так, полученная экстинкция исследуемого образца 2,353, согласно расчётам, – это 3,93 мкмоль гистидин-содержащих дипептидов.

Заключение. Таким образом, нами была доработана методика для определения содержания гистидин-содержащих дипептидов в мышечной ткани, имея её небольшое количество. Данная методика может быть полезна студентам, аспирантам и научным работникам, занимающимся проблемами биологической ценности и фальсификации мышечной ткани.

Литература

1. Лисицын, А. Теория и практика переработки мяса / А. Лисицын. – М. : ВНИИМП, 2006. – 391 с.

2. Болдырев, А. Гистидин-содержащие дипептиды возбудимых тканей / А. Болдырев. – М. : Биоинформсервис, 2004. – 108 с.
3. Nα-ацетилкарнозин – природный гистидин содержащий дипептид как антиоксидант для офтальмологического применения [Электронный ресурс] / М. А. Бабижаев, В.Н. Ермакова, Ю.А. Семилетов, А.М. Деев – Режим доступа: www.ethosrussia.ru/pdf/article10.pdf (03.03.2013)
4. Беляев, М. С. Карнозин как фактор эндоэкологической защиты организма от повреждений, вызванных окислительным стрессом : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.04 / Беляев Михаил Сергеевич. – М., 2008. – 23 с.
5. Qinchum, R. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of mammalian meat in meat and feed products : thesis ... master of science / Qinchum Rao. – Florida, 2004. – 70 p.
6. Аналитическая характеристика карнозина / Д. А. Фадеева [и др.] // Научные ведомости. Серия «Медицина. Фармация». – 2010. - № 22 (93), вып. 12. – С. 179-184.
7. Физико-химические и биохимические основы технологии мяса и мясopодуков : справочник. – М. : Пищевая промышленность, 1973. – 500 с.
8. Храмов, В. А. Определение карнозина в мясе и мясных продуктах / В. А. Храмов, Е. Ю. Гурина // Мясная индустрия. – 2007. - № 7 (июль). – С. 65-66.
9. Определение карнозина в безбелковом экстракте по диазореакции // Антипова Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. – М. : Колос, 2001. – С. 129-131.

(поступила 16.03.2015 г.)

УДК 636.2:637.5.04

В.С. КОЗЫРЬ

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УБОЙНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ШАРОЛЕЗСКОГО СКОТА

Институт сельского хозяйства степной зоны НААН Украины

При изучении возрастных изменений убойных показателей бычков породы шароле выявлены некоторые закономерности и тенденции возрастных изменений убойных показателей. С возрастом не только увеличивается предубойная живая масса животных, но растёт также масса туши, убойная масса, выход туши, убойный выход, масса внутренних органов, языка, мясокостного хвоста, других субпродуктов и внутриволокнистого жира. Желудочный жир с наибольшей интенсивностью откладывался в 18-месячном возрасте, почечный и кишечный – в возрасте 2,5 лет, масса рубца, книжки и сетки с возрастом имеет тенденцию к увеличению, а масса сычуга после 12-месячного возраста практически остаётся неизменной. Масса рубца, сетки, сычуга и книжки относительно предубойной живой массы проявляет тенденцию к снижению, что подтверждается коэффициентами изменения всех отделов желудка в последующие возрастные периоды относительно первоначального (12 месяцев).

Ключевые слова: бычки, шароле, убойные показатели, туша, субпродукты, белок, жир.