

УДК 664.8.037.5

Изменение белковой фракции говядины в цикле «замораживание — хранение — тепловая обработка»

Канд. техн. наук Д. А. БАРАНЕНКО¹, М. САЛАМИ

¹denis.baranenko@niuitmo.ru

Университет ИТМО

191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

*В качестве объекта исследования были выбраны образцы *Musculus semitendinosus* говядины, произведенной на территории Ленинградской области. Для определения изменения доступности белков мяса к действию протеолитических ферментов изучалась атакуемость саркоплазматической и фибриллярной фракции белков трипсином и химотрипсином, выраженная в единицах тирозина, выделившегося при гидролизе в стандартных условиях, на мг белкового азота. Изучено влияние состояния мяса — парное и созревшее, замораживания и хранения в замороженном состоянии при температуре -29 ± 1 °C в течение 7 мес, а также тепловой обработки, на атакуемость двух фракций белков говядины в полученных экстрактах. Показано, что характер изменений атакуемости идентичен для двух групп белков и зависит от состояния мяса до замораживания. Установлено, что фибриллярные белки гидролизуются трипсином и химотрипсином в большей степени. Денатурационные процессы, которые происходят при замораживании и хранении парного и ферментированного мяса при температуре -29 ± 1 °C не оказывают отрицательного влияния на общую усвояемость белков мяса.*

Полученная информация важна при обосновании биологической ценности с учетом коэффициента усвояемости мяса и мясопродуктов после замораживания и тепловой обработки. Данные о воздействии ферментов на белки после предварительной холодильной и тепловой обработки также представляют интерес в случае последующей биотехнологической модификации мясного сырья.

Ключевые слова: холодильная обработка, мясо, саркоплазматические и фибриллярные белки, денатурация, ферменты, трипсин, химотрипсин, усвояемость.

Changes of beef protein fraction in "freezing — storage — heat treatment" cycle

Ph. D. D. A. BARANENKO¹, M. SALAMI

¹denis.baranenko@niuitmo.ru

ITMO University

191002, Russia, Saint-Petersburg, Lomonosova str., 9

*Samples of *Musculus semitendinosus* beef produced in Leningrad region were used as a material for research. The ability of trypsin and chymotrypsin to attack fibrillar and sarcoplasmic protein fractions, expressed in terms of tyrosine units released by hydrolysis under standard conditions per mg of protein nitrogen, was studied to determine the change in meat proteins availability to proteolytic enzymes. The influence of meat autolysis state (fresh-killed and ripe), freezing and frozen storage at -29 ± 1 °C for 7 months, and heat treatment on the availability of two beef protein fractions for enzymes was studied in their extracts. It is shown that the nature of changes in substrate availability for enzymes is identical for the two groups of proteins and depends on the condition of the meat before freezing. It was determined that fibrillar proteins are hydrolyzed by trypsin and chymotrypsin in a greater degree. Denaturation processes during freezing and storage of fresh-killed and ripe meat at -29 ± 1 °C do not adversely affect the overall digestibility of meat proteins. The information obtained is important for justifying the biological value of meat and meat products after freezing and thermal processing, the coefficient of digestibility being taken into account. Data on the effect of enzymes on proteins after refrigeration and heat treatment is also of interest if subsequent biotechnological modification of meat takes place.*

Keywords: refrigeration processing, meat, sarcoplasmic and fibrillar proteins, denaturation, enzymes, trypsin, chymotrypsin, digestibility.

В решении проблемы бесперебойного снабжения населения мясом и мясопродуктами, определяющее значение имеет не только увеличение их производства, но и создание соответствующих запасов. С этой целью значительная часть не только мяса, но и мясопродуктов замораживается [1].

В процессе исследования и обоснования технологических параметров замораживания мяса и мясопродуктов,

а также сроков их годности, учитываются органолептические и физико-химические показатели качества, микробиологические и другие показатели безопасности [2–6]. В ряде работ отечественных и зарубежных авторов отмечается важность изучения денатурационных изменений белков мышечной и соединительной ткани, протекающих при отрицательных температурах, и влияющих на их усвояемость, биологическую ценность и качество мяса

[7–9]. Известные и широко применяемые в промышленных условиях технологии замораживания и хранения мяса и мясных продуктов не исключают криоденатурацию белков мышечной и соединительной ткани [10].

В настоящее время нет однозначного мнения по поводу отрицательного или положительного влияния на усвояемость мяса и мясных продуктов денатурации белков, протекающей при замораживании и хранении продукции при отрицательных температурах [11–13]. Кроме того, следует иметь в виду, что при тепловой обработке мяса и мясных продуктов также происходит денатурация [14].

Теоретическое и практическое значение имеет исследование влияния условий холодильной и тепловой обработки мяса, а также продолжительности хранения на протеолиз белков мяса ферментами желудочно-кишечного тракта. Анализ белковых экстрактов и отдельных белков мышечной и соединительной ткани мяса позволит получить объективную информацию о биологической ценности белков и качестве мяса на различных стадиях хранения в замороженном состоянии. Полученные научные данные могут быть основой для разработки практических рекомендаций замораживания и длительного хранения мяса.

В статье приводятся экспериментальные данные по влиянию условий замораживания и длительности хранения мяса на протеолиз крио- и термоденатурированных белков ферментами желудочно-кишечного тракта.

Объекты и методы исследования

В процессе изучения изменений, происходящих в белках говядины в цикле «замораживание — хранение — тепловая обработка» определяли растворимость и протеолиз белков под действием ферментов трипсина и химотрипсина («Самсон-Мед»). Исследования проводили на полусухожильных мускулах (*Musculus semitendinosus*) говядины 1-ой категории упитанности, взятых от двух туш, произведенных на территории Ленинградской обл. Образцы мяса замораживали в парном (через 2–3 ч после убоя) и созревшем состоянии (после выдержки при температуре 12 °С в течение 48 ч). Мясо замораживали при температуре минус 29 ± 1 °С, хранение осуществлялось при этой же температуре в течение 7 мес.

Образцы мяса в исходном состоянии, после замораживания и периодически в процессе хранения, измельчали при температуре 0 °С с помощью гомогенизатора GM 200 (Retsch) и затем проводили последовательное экстрагирование белков, основанное на их различной растворимости [15].

Получали экстракты саркоплазматических и фибриллярных белков:

— экстракт I содержит саркоплазматические белки и экстрактивные вещества, растворимые при малой ионной силе $\mu = 0,08$ и pH = 7,4;

— экстракт II содержит фибриллярные белки актомиозинового комплекса, растворимые при $\mu = 0,6$ и pH = 8,6.

При изучении атакуемости ферментов на белки мяса после тепловой обработки, экстракты белков прогревали при температуре 80 °С в течение 20 мин. Эта температура лежит выше порога денатурации глобулярных белков. Атакуемость белков выражали в единицах тиро-

зина, выделившегося при гидролизе за 4 ч при температуре 37 °С, при взаимодействии белка с 0,05 мг фермента, или 0,008 мг/мл реакционной смеси ($\gamma_{\text{тир}}$ на мг белкового азота). В данной работе исследуется не скорость гидролитических реакций, а атакуемость, как показатель, характеризующий свойства белков при сохранении постоянства условий гидролиза: времени, температуры и pH.

Результаты и их обсуждение

Данные по изменению атакуемости ферментами саркоплазматических белков (экстракт I) приведены на рис. 1, 2. Как следует из рисунков, исследуемые ферменты по-разному проявляют свои свойства. Саркоплазматические белки очень слабо атакуются трипсином и сильно — химотрипсином.

Характер изменения атакуемости белков ферментами при хранении мяса зависит от его состояния до замораживания и проявляется одинаковым образом, как при действии трипсина, так и химотрипсина, исключение составляет сам процесс замораживания.

При замораживании мяса в парном состоянии атакуемость белков трипсином практически не изменяется, а химотрипсином — значительно снижается. Отмечен одинаковый ход кривых 1 и 2 (рис. 1) с двумя максимумами на первый и пятый месяцы хранения. Спад кривых имеет

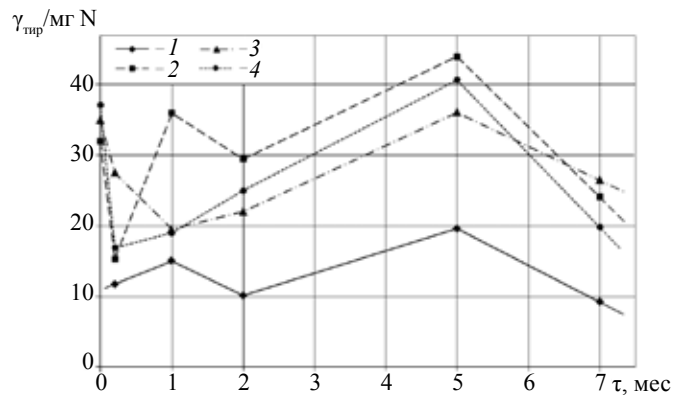


Рис. 1. Атакуемость саркоплазматических белков ферментами в мясе, замороженном в парном состоянии:

1 — трипсин, замороженное мясо; 2 — химотрипсин, замороженное мясо; 3 — трипсин, мясо после термообработки; 4 — химотрипсин, мясо после термообработки

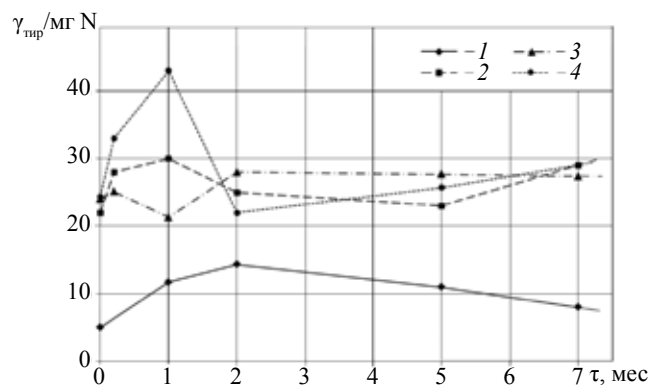


Рис. 2. Атакуемость саркоплазматических белков ферментами в мясе, замороженном в созревшем состоянии:

1 — трипсин, замороженное мясо; 2 — химотрипсин, замороженное мясо; 3 — трипсин, мясо после термообработки; 4 — химотрипсин, мясо после термообработки

место в периоды от 1 до 2-х и после 5-ти мес. Тепловая обработка вносит значительные изменения. Атакуемость саркоплазматических белков трипсином резко возрастает после их прогревания. Наибольший эффект наблюдается в парном мясе. В этом случае атакуемость трипсином возрастает в 3,4 раза (кривая 3, рис. 1).

При замораживании и в начале хранения несколько снижается эффект прогревания, хотя атакуемость прогретых белков выше относительно непрогретых проб. Снижение эффекта прогревания в наибольшей степени проявляется через месяц хранения, так как атакуемость превышает непрогретые белки лишь на 40%. К 2-м месяцам гидролиз прогретых белков находится на том же уровне, но в связи с уменьшением атакуемости непрогретых белков в этот период наблюдается большая разница в 2,1 раза. В последующий период разница в атакуемости прогретых и непрогретых проб белков более или менее сохраняется, несколько возрастая к концу хранения.

В противоположность трипсину, тепловая обработка приводит к снижению гидролиза белков замороженного мяса химотрипсином. Исключение составляют белки исходного мяса и белки мяса непосредственно после замораживания. Атакуемость саркоплазматических белков химотрипсином в этих случаях близка, как в прогретых пробах, так и без тепловой обработки. Особенно значительное снижение атакуемости прогретых белков химотрипсином в 1,8 раза происходит через 1 мес хранения мяса. В последующий период значения прогретых проб приближаются к непрогретым, но остаются ниже последних на 7–17%.

Атакуемость саркоплазматических белков мяса, замороженного после ферментации, имеет иной характер (см. рис. 2). Гидролиз трипсином характеризуется низкими значениями и в этом сходство с мясом, замороженным в парном виде, но изменения при хранении слабо выражены (кривая 1, рис. 2). Уровень гидролиза белков под действием химотрипсина (кривая 2, рис. 2) значительно более высокий, а характер изменения сходен с кривой 1, и в этом белки ферментированного мороженого мяса отличаются от саркоплазматических белков мяса, замороженного в парном виде.

Характер кривых 1 и 2 (рис. 2) показывает некоторое плавное возрастание атакуемости при замораживании и в начале хранения. В период от 1 до 2-х месяцев гидролиз трипсином медленно возрастает, а химотрипсином слабо снижается. В период от 2-х до 5-ти месяцев гидролиз белков постепенно снижается как при действии трип-

сина, так и химотрипсина. Лишь к концу хранения заметно увеличение гидролиза белков химотрипсином, тогда как трипсином — продолжает медленно падать.

Тепловая обработка значительно изменяет свойства белков и, особенно, в начальный период. Атакуемость прогретых белков трипсином увеличивается в 4,8 раза в исходный период. Эффект прогревания сказывается на атакуемости белков трипсином почти в равной степени на всем протяжении хранения, заметно снижаясь лишь к первому месяцу (кривая 3, рис. 2). Но и в этот период гидролиз усиливается по отношению к непрогретым пробам в 1,8 раза.

В отношении химотрипсина видны менее значительные изменения (кривая 4, рис. 2). Атакуемость обработанных белков колеблется в наибольших пределах относительно непрогретых белков (кривая 2). Исключение составляет тот период, который был отмечен для трипсина. В этот период атакуемость максимальна и составляет $43 \gamma_{\text{трип}}/\text{мгN}$, что превышает значения необработанных белков на 44%. В период от 1 до 2-х месяцев атакуемость химотрипсином снижается до $21 \gamma_{\text{трип}}/\text{мгN}$, но в последующий период это свойство стабилизируется в какой-то степени и слабо изменяется от времени хранения мяса. Иными словами нет значительной разницы в атакуемости прогретых и непрогретых белков химотрипсином в указанное время.

Таким образом, саркоплазматические белки экстракта I характеризуются слабой атакуемостью трипсином и относительно высокой гидролизуемостью химотрипсином.

Характер изменения атакуемости белков ферментами зависит от состояния мяса до его замораживания. Несмотря на различный уровень гидролизуемости белка, оба фермента сходным образом влияют на исследуемое свойство белков в динамике хранения мяса.

При замораживании мяса в парном состоянии, кривая атакуемости белков ферментами имеет два максимума на первый и пятый месяцы хранения. Снижение гидролизуемости белков происходит в периоды от 1 до 2-х и после 5-ти месяцев. При замораживании мяса после естественной ферментации атакуемость белков ферментами слабо изменяется в начале хранения, но после 2-х месяцев практически не изменяется, характеризуя устойчивое состояние белков в этот период.

Прогревание (тепловая обработка) белков значительно изменяет их свойства, увеличивая атакуемость трипсином и не влияя заметным образом на гидролиз химотрипсином. В общем характере влияния тепलो-

Атакуемость протеолитическими ферментами фибриллярных белков экстракта II говядины в динамике хранения при температуре $-29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\gamma_{\text{трип}}/\text{мгN}$

Фермент	Состояние мяса	Парное мясо						Созревшее мясо					
		Продолжительность хранения, мес						Продолжительность хранения, мес					
		0	После замораживания	1	2	5	7	0	После замораживания	1	2	5	7
Трипсин	Замороженное	31,3	31,0	53,6	45,9	46,4	37,2	28,2	37,8	22,9	32,5	30,0	21,4
	После тепловой обработки	43,3	43,8	54,7	46,9	69,6	63,2	29,2	46,3	43,1	39,8	47,8	30,5
Химотрипсин	Замороженное	34,3	27,7	32,4	40,9	55,5	28,8	27,2	—	32,7	30,4	33,3	22,1
	После тепловой обработки	21,8	7,5	10,2	25,9	24,2	18,6	13,1	30,3	29,9	8,6	17,7	16,6

го эффекта на гидролиз белков имеются особенности в действии каждого из ферментов, которая проявляется в начале хранения замороженного мяса.

Известно, что при действии денатурирующих факторов скорость гидролиза глобулярных белков протеиназами повышается. Следовательно, усиление гидролиза саркоплазматических белков трипсином после прогревания есть проявление их свойства гидролизываться с большей скоростью после денатурации. Атакуемость химотрипсином относительно высока в исходных непрогретых белках. Связано это с меньшей специфичностью действия химотрипсина на связи в молекуле белка. В связи с этим прогревание не оказывает большого влияния на атакуемость саркоплазматических белков этим ферментом.

Исследования атакуемости фибриллярных белков в экстракте II показали, что эти белки обладают высокой атакуемостью, как под действием трипсина, так и химотрипсина. В таблице (см. стр. 17) приведены экспериментальные данные по влиянию состояния замороженного мяса и продолжительности хранения, а также тепловой обработки на протеолиз фибриллярных белков. Из представленных данных видно, что данная группа белков обладает высокой атакуемостью как под действием трипсина, так и химотрипсина. Процесс замораживания не оказывает влияния на атакуемость трипсином белков замороженного парного мяса и снижает атакуемость химотрипсином, особенно после тепловой обработки. При хранении ферментированного парного замороженного мяса атакуемость белков трипсином увеличивается в течение первого месяца хранения, при последующем хранении постепенно снижается, превышая исходный уровень. После тепловой обработки замороженного парного мяса атакуемость белков на протяжении всего периода хранения увеличивается, за исключением второго месяца.

После замораживания ферментированного мяса атакуемость белков трипсином возрастает в 1,34 и после тепловой обработки — в 1,58 раза, относительно незамороженного. Замораживание и тепловая обработка повышают атакуемость белков химотрипсином в 2,31 раза.

Заключение

Показано, что характер структурных изменений идентичен для двух групп белков и зависит от состояния мяса до замораживания.

Установлено, что фибриллярные белки гидролизуются трипсином и химотрипсином в наибольшей мере. Максимальная атакуемость ферментами характерна для саркоплазматических и фибриллярных белков мяса (экстракты I и II), замороженного после ферментации и, особенно, после их тепловой обработки.

Установлено, что при замораживании и хранении созревшего мяса повышается атакуемость фибриллярных белков трипсином и химотрипсином, саркоплазматических белков — химотрипсином и снижается атакуемость трипсином. Тепловая обработка замороженного мяса повышает атакуемость всех белков трипсином, но снижает гидролиз при действии химотрипсина.

Таким образом, можно сказать, что денатурационные процессы, которые происходят при замораживании

и хранении парного и ферментированного мяса при температуре -29 ± 1 °C не оказывают отрицательного влияния на общую усвояемость (перевариваемость) белков мяса. Этот вывод важен, в частности, при обосновании биологической ценности с учетом коэффициента усвояемости мяса и мясопродуктов после замораживания и тепловой обработки. Приведенные данные о различном воздействии протеолитических ферментов на белки после предварительной обработки дают возможность оценить целесообразность биотехнологической модификации мясного сырья на отдельных этапах производства.

Список литературы (References)

1. Evans J. A. (ed.). *Frozen food science and technology*. — Oxford: Blackwell, 2008. 355 p.
2. Farag K. W. et al. Effect of low temperatures (-18 to $+5$ °C) on the texture of beef lean. *Meat science*. 2009. Vol. 81. No. 1. p. 249–254.
3. Yu X. L. et al. Definition of the optimum freezing time postmortem for manufacturing pork meat. *Journal of Muscle Foods*. 2009. Vol. 20. No 2. p. 186–200.
4. Ouilic S. et al. Kinetic analysis of cooking losses from beef and other animal muscles heated in a water bath — Effect of sample dimensions and prior freezing and ageing. *Meat science*. 2011. Vol. 88. No 3. p. 338–346.
5. Hergenreder J. E. et al. The effects of freezing and thawing rates on tenderness, sensory quality, and retail display of beef subprimals. *Journal of animal science*. 2013. Vol. 91. No 1. p. 483–490.
6. Alexandre E., Brandão T. R. S., Silva C. L. M. *Frozen food and technology*. — John Wiley and Sons, Ltd and Scrivener Publishing. USA, 2013. p. 123–150.
7. Wagner J. R., Anon M. C. Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *International Journal of Food Science & Technology*. 1985. Vol. 20. No 6. p. 735–744.
8. Mackie I. M. The effects of freezing on flesh proteins. *Food Reviews International*. 1993. Vol. 9. No 4. p. 575–610.
9. Xia X. et al. Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze — thaw cycles. *Meat Science*. 2009. Vol. 83. No 2. p. 239–245.
10. Leygonie C., Britz T. J., Hoffman L. C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat science*. 2012. Vol. 91. No 2. p. 93–98.
11. Santé-Lhoutellier V. et al. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and in vitro digestibility. *Meat science*. 2008. Vol. 79. No 4. p. 777–783.
12. Hes M., Korczak J., Gramza A. Changes of lipid oxidation degree and their influence on protein nutritive value of frozen meat products. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2007. Vol. 57. No 3. p. 323–328.
13. Gatellier P., Santé-Lhoutellier V. Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat science*. 2009. Vol. 81. No 2. p. 405–409.
14. Tornberg E. Effects of heat on meat proteins — Implications on structure and quality of meat products. *Meat science*. 2005. Vol. 70. No 3. p. 493–508.
15. Scopes R. K. *Protein purification: principles and practice*. 3rd ed. Springer advanced texts in chemistry. — New York: Springer, 1994. — 380 p.