

XIII Европейский конгресс работников НИИ мясной промышленности

Всесоюзный научно-исследовательский институт
мясной промышленности, СССР

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПИГМЕНТЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Н.Н.Крылова, И.Н.Лукомина

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучено влияние посолочных ингредиентов на конверсию пигментов мяса в зависимости от pH и температуры.

Изменение миоглобина и его производных исследовано методом абсорбционной спектрофотометрии на регистрирующем приборе СФ-10.

Проведено моделирование процесса посола на растворах миоглобина, выделенного из мышечной ткани крупного рогатого скота. При этом выявлена зависимость между скоростью окисления пигмента, pH и температурой.

Изучено влияние различных концентраций нитрита натрия на конверсию миоглобина в модельных опытах.

Аналогичные исследования изменений пигментов мяса выполнены на мышце *longissimus dorsi*.

THE ALL-UNION RESEARCH INSTITUTE OF MEAT INDUSTRY
U S S R

MUSCLE PIGMENTS AS INFLUENCED BY SOME PHYSICAL AND
CHEMICAL FACTORS

N.N.Krylova, I.N.Lukonina

S U M M A R Y

The influence of curing ingredients on meat pigments conversion was studied in relation to pH and temperature.

The alterations of myoglobin and its derivatives were found by absorption spectrophotometry on a recording apparatus CФ-10.

The modelled curing process was studied on the solutions of myoglobin isolated from the muscle tissue of cattle. A relationship was found among the rate of pigment oxidation, the pH-value and temperature.

The influence of various concentrations of sodium nitrite on myoglobin conversion was studied in model experiments.

Similar studies into meat pigments changes were carried out on the long. dorsi muscle.

DER EINFLUSS VON EINIGEN PHYSIKALISCHEN UND CHEMISCHEN
FAKTOREN AUF DIE MUSKELGEWEBSPIGMENTE

N.N.Krylowa, I.N.Lukonina

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde der Einfluß von Pökelingredienzien auf die Farbstoffskонversion im Fleisch in Abhängigkeit von pH und Temperatur untersucht.

Die Veränderung von Myoglobin und dessen Derivaten wurde mittels Absorptions-Spektrophotometrie mit Hilfe eines Registriergerätes CΦ-10 studiert.

Die Modelluntersuchung des Pökellungsvorganges wurde mit den Myoglobinlösungen durchgeführt, wobei das Myoglobin aus dem Muskelgewebe der Rinder gewonnen worden war. Dabei wurde die Abhängigkeit zwischen der Geschwindigkeit der Farbstoffsoxydation, pH und der Temperatur aufgewiesen.

Bei den Modellversuchen wurde der Einfluß von verschiedenen Natriumnitritkonzentrationen auf die Myoglobinkonversion studiert.

Die ähnlichen Untersuchungen über die Veränderung von Fleischpigmenten wurden mit *M. longissimus dorsi* durchgeführt.

INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES
SUR LES PIGMENTS DU TISSU MUSCULAIRE

N.N.Krilova, I.N.Loukonina

S O M M A I R E

On étudiait l'influence des ingrédients de salaison sur la conversion des pigments des viandes dépendant de pH et de la température.

Le changement de la myoglobine et ses dérivées était étudié par la méthode de la spectrophotométrie d'absorption sur l'appareil d'enregistrement CФ-10.

On faisait le modelage du procédé de salaison sur les solutions de la myoglobine séparées du tissu musculaire du bétail.

Lors de ce procédé on établit la dépendance entre la vitesse de l'oxydation du pigment, pH et la température.

On étudiait l'influence du nitrite de soude de diverses concentrations sur la conversion de la myoglobine dans les essais modèles.

Des essais analogues sur les changements des pigments des viandes étaient faits sur le muscle longissimus dorsi.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА
ПИГМЕНТЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Н.Н. Крылова, И.Н. Луконина

Соленые и варено-соленые мясные изделия занимают значительный удельный вес среди продукции, выпускаемой мясной промышленностью. Поэтому исследование факторов, влияющих на образование и стабильность пигментов соленого мяса, является важным вопросом, более глубокое изучение которого позволит выпускать продукцию высокого качества.

Новые данные гигиенистов о токсичности некоторых добавок, в частности нитритов и нитратов, применяемых при посоле мяса, заставляют исследователей определить минимальные дозы этих веществ с тем, чтобы готовый продукт имел стабильную розово-красную окраску и только следы свободного нитрита.

Несмотря на значительное количество работ /1,2,3,4/ по изучению образования нитрозопигментов в мясе, сведений относительно конверсии пигментов и образования нитрозопроизводных недостаточно. Естественно, что при таком сложном процессе как посол мяса, где происходит взаимное влияние посолочных ингредиентов, компонентов мышечной ткани и условий внешней среды, трудно выяснить направленность реакций взаимодействия нитритов с пигментами мышечной ткани.

Некоторые исследователи /5,6/ с целью более детального изучения механизма образования нитрозопигментов использовали растворы гемоглобина. Выбор такого объекта для изучения обусловлен тем, что гемоглобин легко кристаллизуется и его можно получать в больших количествах. Миоглобин, в отличие от гемоглобина, трудно выделить из мышечной ткани и получить в нужном количестве. Кроме того в настоящее время выявлено, что молекулы миоглобина и гемоглобина несколько отличаются по своему строению и физико-химическим свойствам. Поэтому поведение пигментов мышечной ткани особенно важно изучать на миоглобине тем более, что работ в этом направлении сделано мало.

Целью настоящей работы является исследование влияния посолочных ингредиентов на пигменты мышечной ткани.

Материал и методы

В качестве субстрата для изучения действия посолочных ингредиентов были использованы три препарата миоглобина. Кроме того были проведены опыты непосредственно на мясе (*m. longissimus dorsi*) в 5-кратной повторности.

Для выделения миоглобина из мышечной ткани крупного рогатого скота был использован метод Снидера и Айреса /7/ в сочетании с методом Квинна с сотр. /8/, причем концентрирование водного раствора пигмента, в виду длительности протекания этого процесса, было модифицировано.

Кристаллизацию метмиоглобина проводили по методу Левиса и Швейгерта /9/. Чистоту полученных препаратов проверяли по содержанию железа роданидным методом.

После диализа и холодной стерилизации, путем пропускания через фильтр Зейца, устанавливали концентрацию растворов пигментов. Для этого пигмент переводили в цианметмиоглобин и измеряли оптическую плотность раствора при 540 мкм, полученное значение умножали на коэффициент 11,3 /10/.

Для проведения исследования использовали растворы миоглобина с концентрацией пигмента $0,05-0,06 \times 10^{-3}$ мм. Для восстановления метмиоглобина применяли дитионит натрия в количестве 0,06%, т.е. ниже концентрации, влияющей на скорость окисления миоглобина /7/.

Модельные опыты проводили на растворах окси- и метмиоглобина, об изменении которых судили по максимуму поглощения при длинах волн - 580 и 632 мкм.

Определение содержания общего пигмента и нитропигмента проводили по методу Хорвси в модификации Датского института (P. Vagtson).

Конверсию пигментов изучали методом абсорбционной спектрофотометрии на регистрирующем спектрофотометре СФ-10 в пределах длин волн от 400 до 700 мкм. Изменение окраски мяса определяли с помощью спектрального отражения. Количество нитритов по Гриссу. Измерение pH проводили на pH-метре ЛПУ-01.

Изменения миоглобина наблюдали через 2, 4, 6 и 24 часа.

Результаты и обсуждение

На полученных препаратах пигмента из мышечной ткани крупного рогатого скота была проведена серия опытов по моделированию процесса посола.

На изменение пигментов свежего мяса влияют такие факторы, как: свет, парциальное давление кислорода, рН, микроорганизмы, температура и т.д. При технологической переработке мяса для изготовления колбасных изделий к действию вышеуказанных факторов присоединяется еще влияние посолочных ингредиентов и дальнейшая термическая обработка. Поэтому интересно было проследить динамику изменений миоглобина при влиянии рН, температуры, а затем посолочных ингредиентов — поваренной соли и нитритов.

Изучение влияния рН на поведение миоглобина проводили в буферных системах при концентрации фосфатного буфера 0,25 М. Такая концентрация буфера является оптимальной при изучении скорости окисления миоглобина /II/.

Опыты проводили при рН 5,2, 5,6 и 6,4.

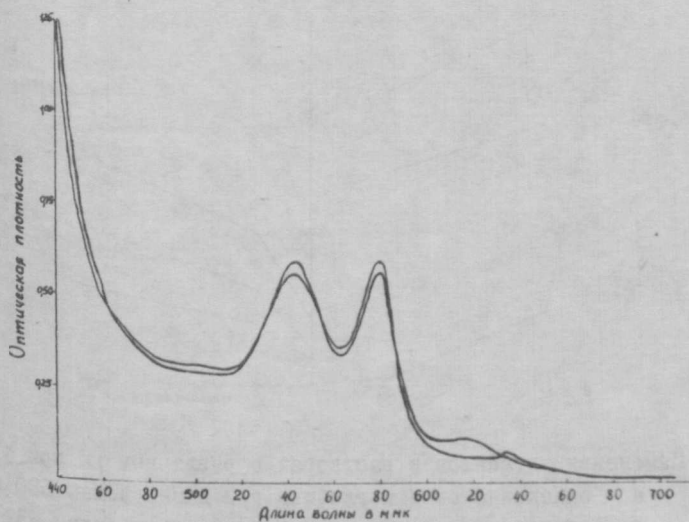


Рис. I. Спектральные кривые раствора пигментов при рН 5,2.

Как показали результаты исследований, исходные значения рН влияют на кинетику изменения миоглобина, т.е. на количество обра-

зовавшегося окси- и метмиоглобина. При pH 5,2 сразу образуется на 10% меньше оксимиоглобина, чем при pH 5,6 и 6,4, а количество метмиоглобина соответственно нарастает. Следует отметить, что при pH 5,2 появляется пик при длине волны 618 мкм, пик нехарактерный для окси- и метмиоглобина, который свидетельствует о появлении в растворе еще третьего пигмента. Через 30 мин. наблюдается перемещение этого пика в сторону более длинных волн, и через 2 часа он полностью переходит в пик метмиоглобина при 632 мкм (рис.1). Наблюдаемое нами явление находит подтверждение в литературе [12].

При pH 5,6 и 6,4 исходные количества окси- и метмиоглобина незначительно колеблются и не появляется пик при 618 мкм.

Изучение изменений пигментов позволило установить, что скорость окисления оксимиоглобина и образования метмиоглобина нарастает к 6 час. при всех значениях pH. Однако количество образовавшегося метмиоглобина находится в прямой зависимости от pH (рис.2).

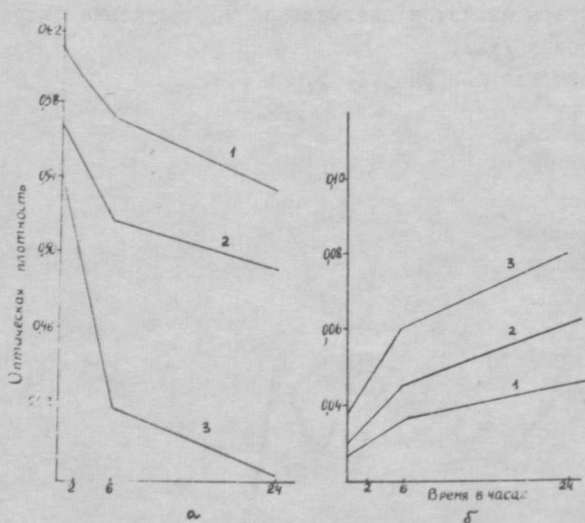


Рис.2. Изменения пигментов в растворах с различным pH при 4°:
 а - окисление оксимиоглобина (при длине волны 580 мμ);
 б - образование метмиоглобина (при длине волны 632 мμ);
 кривые: 1 - при pH 6,4
 2 - при pH 5,6
 3 - при pH 5,2

Аналогичные изменения пигментов происходят в полосе Сорэ, т.е. в полосе наиболее интенсивного поглощения простетической группы миоглобина. Как показали спектрофотометрические кривые, максимум поглощения оксимиоглобина в этой полосе находится при длине волны - 420 мкм, а метмиоглобина - 410 мкм. Смещение максимума поглощения от 420 мкм до 409-407 мкм подтверждает ход процесса окисления.

Конверсию пигментов в зависимости от pH изучали при различных температурных режимах: 4, 10 и -10° .

Повышение температуры ускоряло процесс окисления, однако исходное значение pH оказывало значительное влияние на количество образовавшегося окси-и метмиоглобина. При 10° оксимиоглобин более устойчив в растворах с pH 6,4. Так, количество оксимиоглобина в этом растворе через 24 часа уменьшилось примерно на 10% по сравнению с раствором, выдержанным такое же время при 4° . В растворе с pH 5,6, в аналогичных условиях, оксимиоглобин окислялся на 17,1%; наибольшие изменения происходили в растворе с pH 5,2, в котором содержание оксимиоглобина снизилось на 24,3%. При этом во всех растворах соответственно нарастало количество метмиоглобина.

Как показали опыты, наиболее резкие изменения происходили в растворах оксимиоглобина при -10° , что согласуется с литературными данными [13]. В растворах с pH 5,2, а также с pH 5,6, уже через 2 часа происходила денатурация пигмента, и весь оксимиоглобин окислялся до метмиоглобина; при pH 6,4 через этот же промежуток времени сохранялось значительное количество оксимиоглобина, и процесс окисления проходил значительно медленнее (рис.3).

Таким образом, до начала процесса посола пигменты мышечной ткани претерпевают окислительные изменения в зависимости от pH и температуры.

При добавлении поваренной соли к растворам пигмента происходит образование метмиоглобина, причем скорость реакции зависит от концентрации соли. В работе были исследованы концентрации соли от 0,5% до 2,5%. Было выявлено, что при добавлении 0,5% поваренной соли к растворам оксимиоглобина происходило образование метмиоглобина, более резкие изменения отмечены при добавлении 2,5% соли. Действие поваренной соли усиливалось при понижении pH, повышении температуры и продолжительности выдерживания растворов пигмента. Кроме того, добавление соли вызывало сдвиг реакции в более кислую сторону на 0,2 ед.

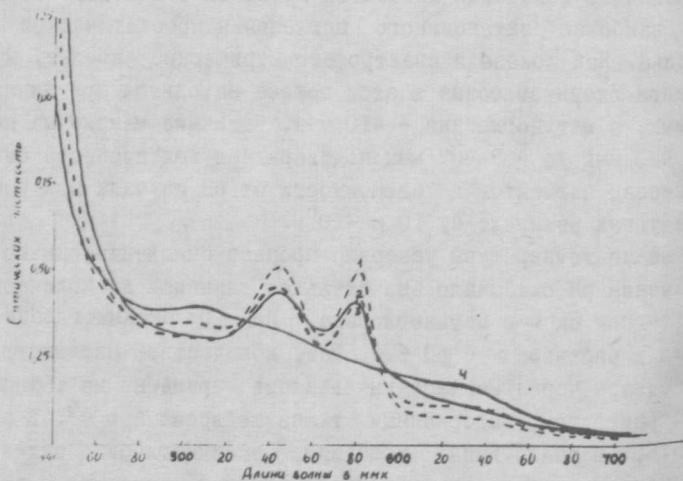


Рис.3. Спектральные кривые растворов пигментов при -10° :

- при pH 6,4: 1 - исходный раствор
 2 - через 2 часа
 при pH 5,2: 3 - исходный раствор
 4 - через 2 часа.

Изучение образования нитрозопигментов проводили на модельных опытах при добавлении различных количеств нитрита: 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,5 и 10 мг%. Как показали опыты, добавление к растворам пигмента незначительных количеств нитрита (0,5 мг%) вызывает образование метмиоглобина. Увеличение количества нитрита приводит к повышению скорости окисления миоглобина в метмиоглобин и образованию большего количества метмиоглобина в растворе. Следует отметить, что влияние нитрита на образование метмиоглобина значительно выше, чем действие поваренной соли.

При добавлении нитрита к раствору миоглобина был получен нитрозомиоглобин с максимумами поглощения при длинах волн - 546 и 578 мкм. Однако при добавлении нитрита к растворам оксимиоглобина и метмиоглобина не был получен нитрозомиоглобин, а происходило окисление оксимиоглобина и образование метмиоглобина (рис.4).

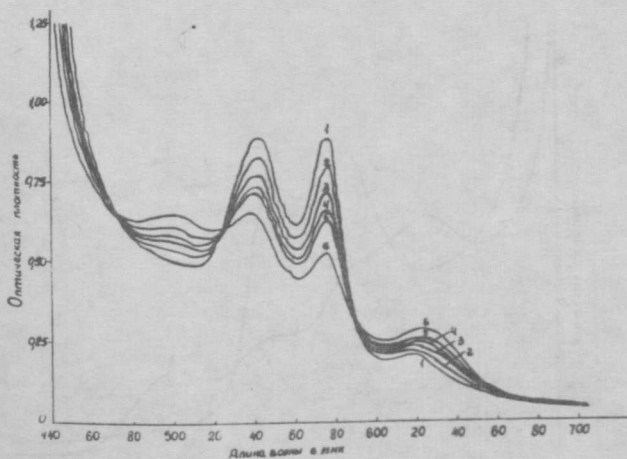


Рис.4. Спектрофотометрическое изменение, вызванное действием нитрита (10 мг%) на раствор оксимиоглобина:

- кривые: 1 - исходный раствор
 2 - через 5 мин. после добавления нитрита
 3 - через 10 мин. после добавления нитрита
 4 - через 15 мин. после добавления нитрита
 5 - через 30 мин. после добавления нитрита
 6 - через 1 час. после добавления нитрита

Раствор нитрозомиоглобина неустоек и разрушается на воздухе даже при 4° , при этом образуется метмиоглобин и незначительное количество оксимиоглобина (рис.5). В атмосфере азота устойчивость нитрозомиоглобина повышается и разрушение его происходит примерно в 3 раза медленнее.

При нагревании нитрозомиоглобин превращается в нитрозомиохромоген. Идентичные спектры нитрозомиохромогенов были получены при записи ацетоновых растворов пигментов в модельных опытах и ацетоновых вытяжек из мясного фарша. Следует отметить, что при любых концентрациях добавленного нитрита в растворах пигментов обнаруживались свободные нитриты.

Таким образом моделирование процесса посола на растворах миоглобина позволило выявить динамику изменений пигментов мышечной ткани.

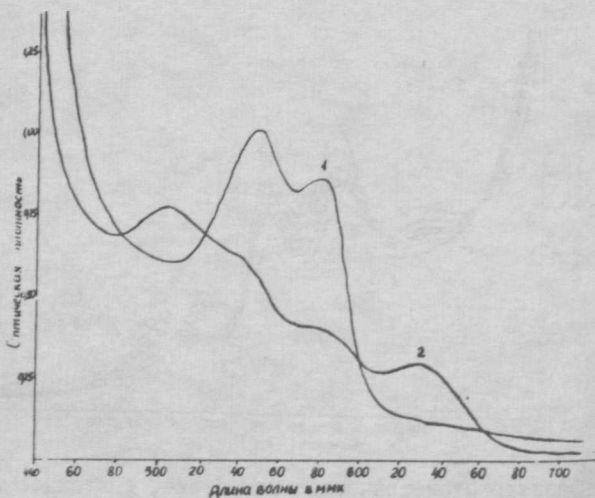


Рис.5. Спектральные кривые раствора нитрозомиоглобина:

1 - исходный раствор

2 - через 18 час.

В мясе, которое является сложной гетерогенной системой, в отличие от растворов миоглобина, посолочные ингредиенты реагируют не только с пигментами, но и с другими составными частями мяса. Поскольку в мясе значения pH варьируют в довольно широких пределах (5,2-6,5), для каждого опыта при определении влияния посолочных ингредиентов определялся исходный pH.

Добавление 2,5% поваренной соли к мясному фаршу с pH 5,6 вызвало образование метмиоглобина уже через 2 часа, в то время как в мясном фарше с pH 6,5 при снятии спектра появлялась слабая полоса отражения при длине волны 632 мкм только через 8 час. выдерживания фарша при температуре 4°. Следовательно, в процессе воздействия поваренной соли на фарш происходит окисление оксимиоглобина и образование метмиоглобина, скорость которого зависит от pH.

В соответствии с модельными опытами к соленому фаршу добавляли различные количества нитрита. Нитрит, в концентрации 0,5 мг%, оказывал аналогичное действие на пигменты мяса, т.е. вызывал образование метмиоглобина. С увеличением дозировки нитрита до 10 мг% количество метмиоглобина нарастало.

При нагревании 100-150г мясного фарша после выдержки в течение 2 час. при 18°, а затем 24 час. при 4°, с нитритом в количестве 3,0, 5,0, 7,5 и 10мг% было получено различное содержание нитрозомиохромогена. Фарш нагревали в стеклянных стаканах на водяной бане (75-80°) до достижения внутри его 68°. Так, при концентрации 3мг% было обнаружено 43% нитрозомиохромогена от общего количества пигмента, при 5 мг% - около 83%, а при 10 мг% наблюдалось некоторое снижение количества нитрозомиохромогена до 72%.

При выдерживании фарша с 3мг% нитрита в течение 24 час. и последующем нагревании в ацетоновых вытяжках нитрозомиохромоген не обнаруживался. В фарше с 10мг% нитрита было обнаружено в 2 раза меньше нитрозомиохромогена по сравнению с фаршем, выдержанным в течение 2 час. При дозировке 5 мг% нитрита через 24 часа выдерживания фарша количество нитрозомиохромогена уменьшилось только на 1/3 по сравнению с количеством, обнаруженным после выдержки в течение 2 час.

Заключение

На основании проведенных опытов при изучении влияния таких физико-химических факторов как pH, температуры и посолочных ингредиентов удалось уточнить ход реакции образования нитрозопигментов.

В модельных опытах было выявлено влияние pH и температуры на скорость окисления миоглобина. Образование метмиоглобина в больших количествах наблюдалось при pH 5,2 и температуре 10 и -10°, причем минусовая температура оказывала более резкое воздействие. Оптимальной является температура 4°, т.к. в этом случае оксимиоглобин окисляется медленнее.

При добавлении 2,5% поваренной соли образуется метмиоглобин, но действие соли, по сравнению с действием pH, температуры, концентрации нитрита, значительно меньше.

При нагревании, очевидно, оксимиоглобин диссоциирует, при этом в атоме железа освобождается связь для присоединения окиси азота, в результате чего образуется нитрозопигмент. В опытах на растворах метмиоглобина при добавлении нитрита не происходило образование нитрозопигмента, т.к. в системе отсутствовали восстановительные условия. В мясе метмиоглобин может быть восстановлен за счет

окислительно-восстановительных систем (таких как цистеин-цистин, SH -глутатион- SS -глутатион, аскорбинат-дегидроаскорбинат), а также ферментных систем, и затем, вступая в реакцию с окисью азота, образовывать нитрозопигмент.

При посоле мяса важным фактором является время выдержки фарша с нитритом. Суточная выдержка приводит к уменьшению образовавшегося нитрозопигмента по сравнению с выдержкой в течение 2 час.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erdman A.M., Watts B.M. Meat pigments. Spectrophotometric determination of color change in cured meat. "J. Agric. Food. Chem.", 5, 6, 1957, 453.
2. Watts B.M. Rew conserve France et Outre-mer, 16, 6, 1961, 88-90, 96-97, 99.
3. Грау Р. Биохимические основы технологии пищевых производств - У Международного биохимического конгресса, М. 1961.
4. Rödiger K. Farbe und Farbveränderungen von Fleisch und Fleischwaren und Möglichkeiten ihrer Beeinflussung. "Der Fleischermeister", 18, 10, 11, 1964, 260, 291.
5. Keilin D., Hartree E. Reaction of nitric oxide with hemoglobin and methemoglobin Nature, 139, 1937, 548.
6. Urbain W.M., Jensen L.B. The heme pigments of cured meats. I. Preparation of nitric oxide hemoglobin and stability of the compound. "Food Res". 5, 6, 1940, 593.
7. Snyder H.E., Ayres J.C. The oxidation of crystallized beef myoglobin "J. Food. Sci". 26, 5, 469, 1961.
8. Quinn J.R., Pearson A.M., Brunner J.R. Detection and isolation of multiple myoglobins from beef muscle. J. Food. Sci", 29, 4, 1964, 422.
9. Lewis U.J., Schweigert B.S. Biochemistry of myoglobin. III. Homogeneity studies with crystalline beef myoglobin "J. Biol. chem" 214, 2, 1955, 647.

10. Bowen W.J. The absorption spectra and extinction coefficients of myoglobin. "J. Biol. chem", 179, 1, 1949, 235.
11. Brown W.D., Dolev A. Autoxidation of beef and tuna oxymyoglobins "J. Food Sci", 28, 2, 1963, 207.
12. Glidden M., Mangel M., Singleton K., Stone M. Observations on the behavior of meat pigments in solutions. "Food Res". 25, 1, 1960, 127.
13. Brown W.D., Dolev A. Effect of freezing on autoxidation of oxymyoglobin solutions. "J. Food Sci", 28, 2, 1963, 211.

L I S T O F F I G U R E S

Fig. 1. Spectral curves of pigment solutions at pH=5.2

Fig. 2. Pigment changes in solutions having different pH-values at 4°C:

- a - oxymyoglobin oxydation (at the wavelength 580 m μ)
- b - metmyoglobin formation (at the wavelength 632 m μ)

Curve 1 - pH=6.4

- " - 2 - pH=5.6

- " - 3 - pH=5.2

Fig. 3. Spectral curves of pigment solutions at -10°C.

at pH=6.4: 1 - the initial solution

2 - after 2 hr holding

at pH=5.2: 3 - the initial solution

4 - after 2 hr holding

Fig. 4. Spectrophotometric changes caused by nitrite (10 mg%) effect on oxymyoglobin solution:

Curve 1 - the initial solution

2 - 5 min. after nitrite was added

3 - 10 " " " " "

4 - 15 " " " " "

5 - 30 " " " " "

6 - 1 hr " " " " "

Fig. 5. Spectral curves of a nitrosomyoglobin solution:

1 - the initial solution

2 - after 18 hr. holding at 4°C