

Е.Ф.Орешкин, М.А.Борисова и Г.С.Чубарова. ВНИИ мясной промышленности, Москва, СССР. С.Б.Коровкин, Ю.Г.Костенко и И.И.Касьяненко. Московский технологический институт мясной и молочной промышленности

Качество готовых продуктов из мяса в значительной степени определяется состоянием мясного сырья, а так же его изменениями при переработке. В связи с этим в мясной промышленности в течение многих лет проводятся работы по изучению качественных показателей мяса и их изменений под влиянием различных видов воздействий с помощью органолептических, биохимических, гистологических и физико-химических методов, включая ИК-спектрометрию, ЯМР, ЭПР и др. Однако применение такого метода как собственная флуоресценция белка при анализе пищевых продуктов, согласно литературным данным, незначительно /1/, хотя этот чувствительный, точный, безинерционный метод с успехом используют при исследованиях белков в растворах /2/.

Метод основан на способности ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и фенилаланина), являющихся составной частью многих белков, флуоресцировать в ультрафиолетовой области. В зависимости от структуры белка, а следовательно от расположения и состояния ароматических аминокислотных остатков, основные параметры его флуоресценции (положение спектра, его ширина, площадь под спектром, дающая информацию о квантовом выходе флуоресценции) существенно меняются. Это определяет информативность метода собственной флуоресценции белка в аспекте изучения его структуры и ее изменений.

Мясо является сложной гетерогенной системой, основную часть которой составляют мышечные и соединительнотканые белки. Именно их состояние определяет такие важ-

нейшие показатели как ВСС, нежность, сочность и др.

В данной работе исследовали конформационные изменения мышечных белков говядины в процессе нагрева от 20 до 85°C на основе измерения спектров флуоресценции белка. Предварительно проведенные нами исследования показали, что внутримышечная соединительная ткань в ультрафиолетовой области послесвечением не обладает. Одновременно проводили гистологический анализ аналогичных образцов мяса. Измерение флуоресценции осуществляли совместно с сотрудниками группы спектроскопии ИБФ АН СССР на установке, описанной в работе /3/x. Исследование проводили на полосках мяса (2,0x0,5 см), взятых от длиннейшей мышцы спины крупного рогатого скота. Анализировали охлажденное и соленое мясо. Посол осуществляли раствором, содержащим поваренную соль, пирофосфаты, аскорбинат натрия, глюкозу, сахар, нитрит натрия в течение одних суток.

При снятии спектров образец помещали в герметически закупоренную кювету. Длина волны возбуждающего света была 280,4 нм. Образец нагревали со скоростью 1°C/мин, спектры флуоресценции снимали через каждые 2-3 минуты. Спектры при каждой температуре анализировали с точки зрения модели дискретных форм триптофанилов в белках /2,4/.

Согласно этой модели, основанной на многочисленных экспериментальных данных, остатки триптофана в белках существуют не во всех состояниях равновероятно, а есть несколько наиболее вероятных состояний, в которые они попадают. Различают по меньшей мере четыре спектральные формы триптофанилов, обозначенные S', I, II, III.

Спектральные формы S' и I соответствуют локализации остатка триптофана внутри белковой молекулы в областях, недоступных воде, и различаются друг от друга лишь стахиометрией комплексов возбужденного хромофора с соседними полярными группировками.

Спектральные формы II и III отвечают локализации триптофанилов на поверхности белка в контакте с молекулами либо связанной (форма II), либо свободной (форма III) воды.

Дополнительную информацию о структуре белков дает вклад в их флуоресценцию остатков тирозина.

x Авторы приносят глубокую благодарность доктору биологических наук Э.А.Бурштейну и кандидату физико-математических наук Е.А.Пермякову за помощь в работе.

Отбор образцов для гистологического исследования начинали с достижения в них 45°C с интервалом 5°C , фиксировали в забуференном 10%-ном растворе нейтрального формалина, по общепринятой методике заключали в целлоидин, а срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологические измерения проводили с помощью откалиброванного окуляр-микрометра на срезах с поперечным сечением мышечных волокон.

При нагреве охлажденного мяса в диапазоне температур $20-85^{\circ}\text{C}$ в спектрах флуоресценции мясных белков можно выделить три зоны: А ($45-52^{\circ}\text{C}$), В ($52-70^{\circ}\text{C}$) и С (выше 70°C). В зоне А происходит сдвиг максимума флуоресценции на ~ 1 нм в коротковолновую область, уменьшение его ширины на ~ 2 нм и резкое падение величины выхода флуоресценции (рис. 1). Одновременно на кривых температурной зависимости вклада отдельных форм триптофанилов и тирозина в интенсивность флуоресценции наблюдается увеличение количества S' формы (рис. 2). Эти данные показывают, что в температурной зоне ($45-52^{\circ}\text{C}$) наблюдаются коагуляционные изменения в структуре мясных белков, когда часть остатков триптофана переходит в более жесткое, гидрофобное окружение за счет сближения соседних молекул белка. Результаты гистологического анализа показывают, что хотя в области этих температур заметных изменений микроструктуры мяса не происходит, однако толщина волокон незначительно уменьшается, а по периферии образцов и внутри их, между волокнами, наблюдается появление мелкозернистой массы, то есть, как следствие процесса миофибриллярной коагуляции, сближения, происходит образование и выход жидкой фазы за пределы образца.

В зоне В ($52-70^{\circ}\text{C}$) отмечен сдвиг максимума флуоресценции в длинноволновую область на ~ 4 нм, уширение, а затем вновь сужение ширины спектра, а так же замедление падения выхода излучения. На рис. 2 одновременно наблюдается рост вклада излучения тирозина и поверхностной формы III триптофанилов за счет уменьшения вклада форм S' и II.

Полученные результаты позволяют предположить, что в области этих температур происходит собственно денатурационные изменения в структуре мясных белков, приводящие к разрыхлению их структуры.

Данные флуоресцентного анализа подтверждаются гистологическими исследованиями, согласно которым в этой температурной зоне структура мышечной ткани выглядит наиболее рыхлой за счет порозного расположения мышечных волокон и выраженности их поперечных трещин и разрывов. Толщина волокон увеличивается на $7-9\%$ и при этом в них отчетливо проявляется продольная исчерченность.

В зоне С (выше 70°C) максимум спектра флуоресценции вновь сдвигается в коротковолновую область, спектр уширяется, а выход флуоресценции постепенно уменьшается. Вклад форм S' и III в общий спектр флуоресценции увеличивается за счет уменьшения излучения формы I. Эти спектральные изменения можно интерпретировать как отражение вторичного процесса коагуляции на фоне денатурационных изменений.

Подтверждением сделанных выводов являются данные о наличии процесса заметного уплотнения мяса на микроструктурном уровне при нагреве выше 70°C . Так, мышечные волокна располагаются уже тесно друг к другу, выраженность их трещин и разрывов уменьшается. Толщина волокон снижается на $6-7\%$, и при этом продольная исчерченность выявляется уже нечетко.

При нагреве соленого мяса на спектрах флуоресценции наблюдаются четыре довольно четко обозначенные зоны, в которых происходят наиболее выраженные изменения белков мяса: зона А ($40-55^{\circ}\text{C}$), зона В ($55-61^{\circ}\text{C}$), зона С ($62-70^{\circ}\text{C}$) и зона D (выше 70°C) (рис. 2).

В зоне А ($40-55^{\circ}\text{C}$) происходит небольшой длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции, резкое замедление температурного тушения излучения и даже его некоторый рост (рис. 1).

Одновременно на графике зависимости интенсивности флуоресценции от температуры для тирозина и отдельных форм триптофанилов в этой зоне наблюдается уменьшение вклада излучения S' формы и увеличение излучения формы I (рис. 2). По-видимому, это можно объяснить тем, что в области температур ($40-55^{\circ}\text{C}$) происходят собственно денатурационные изменения в структуре мясных белков.

Гистологические исследования аналогичных образцов свидетельствуют о том, что при нагреве мяса от 45 до 55°C расположение мышечных волокон становится менее плотным, разрывы и трещины более выражены. Толщина волокон увеличивается почти на 15% , и становится видимой исчерченность, которая в соленом мясе отсутствует.

Зона В ($55-61^{\circ}\text{C}$) характеризуется небольшим коротковолновым сдвигом максимума флуоресценции и резким падением выхода излучения (рис. 1), что свидетельствует о существенных структурных изменениях в белках мяса в области этих температур. Коротковолновый сдвиг максимума (рис. 1) и замедление изменения вкладов в излучение триптофанилов форм S' и I (рис. 2) позволяет предположить, что эти изменения носят коагуляционный характер. На существование этого процесса указывают и гистологические данные, подтверждающие образование и начало выхода жидкой фазы за пределы образцов при достижении 60°C , а так же стабилизация и даже не-

которое уменьшение толщины мышечных волокон в интервале этих температур. В зоне С (61-70)°С вновь происходит длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции и существенное замедление падения выхода излучения. Одновременно уменьшается вклад в излучение формы I и II, появляется и растет излучение остатков тирозина и поверхностных триптофанилов формы III.

Гистологическая картина аналогичных образцов фиксирует наиболее порозное расположение мышечных волокон, наблюдаемое в процессе нагрева, и выраженность их разрывов. На фоне максимального увеличения толщины волокон (до 20%) отчетлива и продольная исчерченность.

В зоне D (выше 70°С) наблюдается хорошо выраженный сдвиг максимума излучения в коротковолновую сторону, незначительное падение выхода флуоресценции, рост вклада формы I триптофанилов, уменьшение количества формы I и одновременное увеличение вклада триптофанилов формы III. Результаты гистологического анализа свидетельствуют о том, что с достижением 75-80°С структура мышечной ткани уплотняется. Разрывы волокон выражены в меньшей степени за счет сдавливания их концов в местах разрывов соседними волокнами. Происходит заметное уменьшение их толщины и сглаживание продольной исчерченности.

Все эти изменения дают основание предположить, что в зоне D при температурах выше 70°С происходит процесс изменения структуры мясных белков, носящий явно выраженный коагуляционный характер (слипание).

Отмечаемые денатурационные изменения в белках (рост поверхностной III формы триптофанилов), хотя и продолжаются, но коагуляционные процессы оказывают преобладающее влияние на микроструктурные изменения.

Таким образом, сравнивая результаты, полученные с помощью анализа спектров собственной флуоресценции белков мяса, и гистологическими методами, можно сделать заключение что:

1) тепловая денатурация мясных белков, как у охлажденного, так и соленого мяса, протекает в несколько стадий, соответствующих определенным температурным интервалам;

2) воздействие посолочных ингредиентов приводит к тому, что первая низкотемпературная стадия структурных изменений, носящих коагуляционный характер, протекает у соленого мяса при более высоких температурах, причем ей предшествует собственно денатурационный, разрыхляющий, процесс, который у охлажденного не соленого мяса не выражен;

3) несмотря на то, что начало разрыхления структуры после низкотемпературной коагуляции белков у соленого мяса сдвинуто к $\sim 62^{\circ}\text{C}$, по сравнению с $\sim 52^{\circ}\text{C}$

для охлажденного, температурный предел этого процесса для обоих видов мяса одинаков - 70°C ;

4) при подъеме температуры выше 70°C в обоих случаях наступает вторая, высокотемпературная стадия коагуляционных конформационных изменений мясных белков, которая по своей глубине и выраженности значительно сильнее первой.

Литература

1. Красников В.В., Тимошкин Е.И. Люминисценция пищевых продуктов. - М.: Легкая промышленность, 1983.
2. Бурштейн Э.А. Собственная люминисценция белка как метод изучения быстрой структурной динамики. - Молекулярная биология, 1983, т. 17, № 3, с. 455-467.
3. Permyakov E.A., Burstein E.A., Sawada I., Jamasaki I. Luminescence of phenylalanine residues in superoxide dismutase from green pea. - Biochem. Biophys. Acta, 1977, 49, № 1, p. 149-154.
4. Бурштейн Э.А. Собственная люминисценция белка. Природа и применение. - Итоги науки и техники, сер. Биофизика. - М.: ВИНТИ, 1974, т. 7, с. 16.

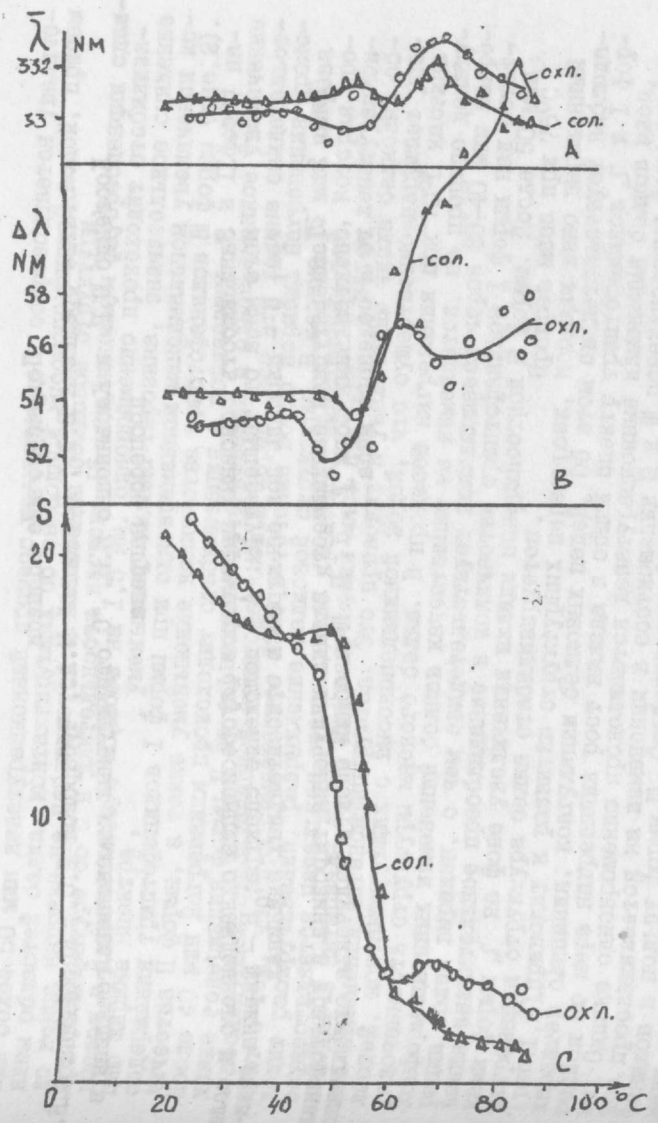


Рис. 1

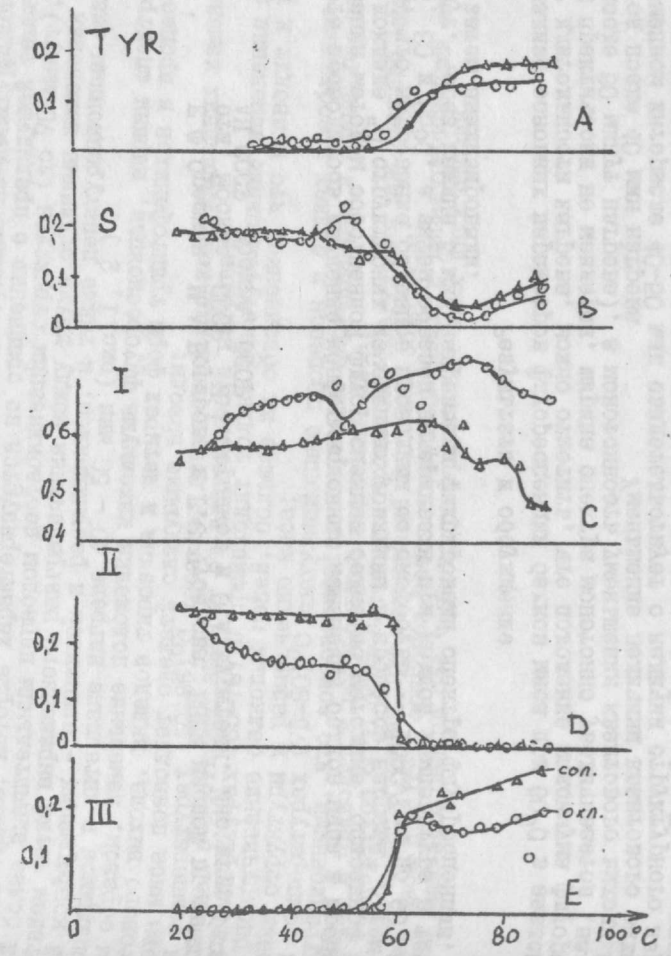


Рис. 2

Подписуночные подписи

к статье Орешкина Е.Ф., Борисовой М.А., Чубаровой Г.С., Коровкина С.Б.,
Костенко Ю.Г. и Касьяненко И.И. "О структурных изменениях говядины в
процессе нагрева

Рис. 1 Зависимость основных параметров флуоресценции охлажденного и соленого мяса от температуры: А - положение спектра; В - ширина спектра; С - площадь под спектром в относительных единицах

Рис. 2 Температурная зависимость вклада излучения тирозина и триптофановых спектральных форм I, II, III в общий спектр излучения охлажденного и соленого мяса

