

EDWARD KOŁAKOWSKI, MAREK WIANECKI, IWONA MILEWSKA

TEMPERATURA CIEPLNEJ KOAGULACJI BIAŁEK MIĘŚNIOWYCH RYB I ZWIERZĄT RZEŹNYCH WYBRANYCH GATUNKÓW

Streszczenie

Posługując się wcześniej opracowaną metodą termomechaniczną wyznaczono zakresy temperatury cieplnej koagulacji białek miofibrylarnych i sarkoplazmatycznych mięsa 5 gatunków ryb (12 partii surowca) oraz wołowiny i wieprzowiny, a także graniczną temperaturę denaturacji wszystkich białek mięśniowych. Wykazano, że pomimo podobnej temperatury dogrzania mięsa (ok. 77°C), potrzebnej do pełnego zdenaturowania wszystkich białek, temperatura pełnej koagulacji białek miofibrylarnych (bez wolnej aktyny, która występowała sporadycznie w badanych próbach) była różna i wynosiła: w przypadku ryb morskich ok. 48 °C, ryb słodkowodnych ok. 51 °C, a zwierząt rzeźnych ok. 56 °C. Okres tarła ryb nie miał istotnego wpływu na zakresy temperatury koagulacji poszczególnych frakcji białek, natomiast powodował zmniejszenie wielkości pików frakcji białek sarkoplazmatycznych.

Słowa kluczowe: temperatura, denaturacja, mięso, ryby, zwierzęta rzeźne

Wstęp

Obróbka cieplna jest jednym z podstawowych procesów jednostkowych stosowanych w przetwórstwie rybnym. Służy ona zarówno do utrwalenia żywności, jej kulinarnego przygotowania, restytucji, jak również do uszlachetniania surowców przed ich dalszym przerobem na gotowe wyroby [7, 8]. Na przykład w produkcji konserw rybnych w zalewach olejowych wstępna obróbka cieplna (WOC: parowanie, podsuszanie, podwędzanie lub inne) powinna zagwarantować usunięcie z surowca tyle wody, aby podczas sterylizacji nie następowało jej dalsze uwalnianie się i mieszanie z olejem. Jednak nadmierne usunięcie wody podczas WOC bardzo pogarsza teksturę mięsa sterylizowanych ryb. Usuwanie nadmiaru wody z mięsa ryb podczas WOC jest z kolei ściśle związane z przebiegiem denaturacji białek mięśniowych [7, 8].

Przyjęte w instrukcjach technologicznych parametry WOC nie zawsze są optymalne. Zwykle są one bardziej dostosowane do zachowania bezpieczeństwa żywności niż do celów technologicznych [8]. Nieuzasadnione zawyżanie parametrów WOC powoduje niepotrzebne straty składników odżywczych mięsa ryb.

Markowski i wsp. [11] wykazali, że wpływ temperatury na proces denaturacji białka mięsa ryb jest większy niż wpływ czasu. Przy stosowaniu odpowiednio wysokiej temperatury dogrzania czas obróbki jest na tyle krótki, że może być pominięty przy wyznaczaniu zależności.

Odporność białek mięśniowych na ogrzewanie różni się w zależności od gatunku ryby. Na przykład oczyszczona miozyna dorsza jest szczególnie niestabilna termicznie, tworząc szybko agregaty [2], podczas gdy miozyna ryb pochodzących z wód ciepłych (np. *Lutianus sebae*) jest bardziej stabilna, chociaż mniej niż miozyna ssaków [3]. Miozyna mięsa ryb podlega szybszym i głębszym zmianom denaturacyjnym podczas obróbki cieplnej niż miozyna zwierząt rzeźnych [3]. Większość badaczy uzasadnia tę różnicę inną temperaturą ciała *in vivo* zwierząt zmiennocielnych i stałocielnych [5]. Ogawa i wsp. [13] stosując DSC wykazali, że denaturacja miozyny karpia rozpoczyna się w temp. 30 °C, podczas gdy miozyny królika w temp. 40 °C. Ponadto miozyna królika wykazywała tylko jeden pik denaturacyjny, a miozyna karpia dwa piki, odpowiadające prawdopodobnie denaturacji subfragmentu S-1 i lekkiej meromiozyny (LMM), co potwierdza wysoką niestabilność miozyny ryb.

Do bliższego poznania temperatury denaturacji białek znacznie przyczyniło się wprowadzenie różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), która pozwala badać białka mięśniowe bez potrzeby ich izolowania z mięsa [4]. Aparatura ta jest bardzo kosztowna, co przekracza możliwości finansowe wielu laboratoriów badawczych. Ponadto, poważną wadą tej metody jest mała wielkość próbki pobieranej do badań, nieprzekraczająca kilkudziesięciu miligramów. Pobranie takiej próbki z tkanki mięśniowej tak, aby była ona reprezentatywna, nastęrcza poważne trudności. Zastosowanie elektroforezy białek do wyznaczenia końcowej („end-point”) temperatury ogrzewania mięsa ryb [16] jest również kłopotliwe i czasochłonne. Kołakowski i Wianecki [9] opracowali metodę wyznaczenia temperatury koagulacji podstawowych frakcji białek mięśniowych ryb bezpośrednio w mięsie bez potrzeby ich wstępnej izolacji, polegającą na dogrzewaniu dużej próby mięsa (ok. 1 kg) z szybkością ok. 1 °C/min do ok. 90 °C. Metodę tę nazwano termomechaniczną.

Celem niniejszej pracy było wyznaczenia temperatury cieplnej koagulacji frakcji białkowych mięsa ryb wybranych gatunków metodą termomechaniczną i porównanie z wynikami temperatury koagulacji białek wieprzowiny i wołowiny.

Materiały i metody badań

Badania wykonano na 12 partiach ryb świeżych (nie mrożonych), obejmujących 5 gatunków (płoc, leszcz, karp, śledź bałtycki i dorsz bałtycki) i 2 partiach mięsa zwierząt rzeźnych, obejmujących: udziec wołowy bez kości i tłuszcz, schab wieprzowy bez kości i tłuszcz. Wszystkie partie ryb, a szczególnie leszcza, były celowo zróżnicowane pod względem daty połowów i stopnia dojrzałości gonad (tab. 1).

Ryby pochodziły z Zatoki Pomorskiej (śledź, dorsz), Jeziora Dąbskiego, (płoc, leszcz), i stawów hodowlanych k/Chociwła (karp), a mięso zwierząt rzeźnych z Zakładów Mięsnych w Szczecinie-Dąbiu.

Ryby, po dostarczeniu do laboratorium i oddzieleniu lodu, oprawiono ręcznie do postaci tusz, płukano w bieżącej wodzie wodociągowej i pozostawiano do ocieknięcia (ok. 20 min). Tusze przepuszczano przez separator bębnowy typu NF 13X (Bibun, Japonia) o średnicy otworów w bębnie 4 mm, a otrzymane mechanicznie odkostnione mięso (MOM) doczyszczano na separatorze ślimakowym (streinerze) typu SUB 420 (Bibun, Japonia) o średnicy otworów w siatce 2,7 mm w celu usunięcia resztek ości i skóry.

Mięso zwierząt rzeźnych rozdrabniano w wilku o średnicy oczek siatki 4 mm. Po wymieszaniu, poszczególne próby mięsa pobierano bezzwłocznie do badań.

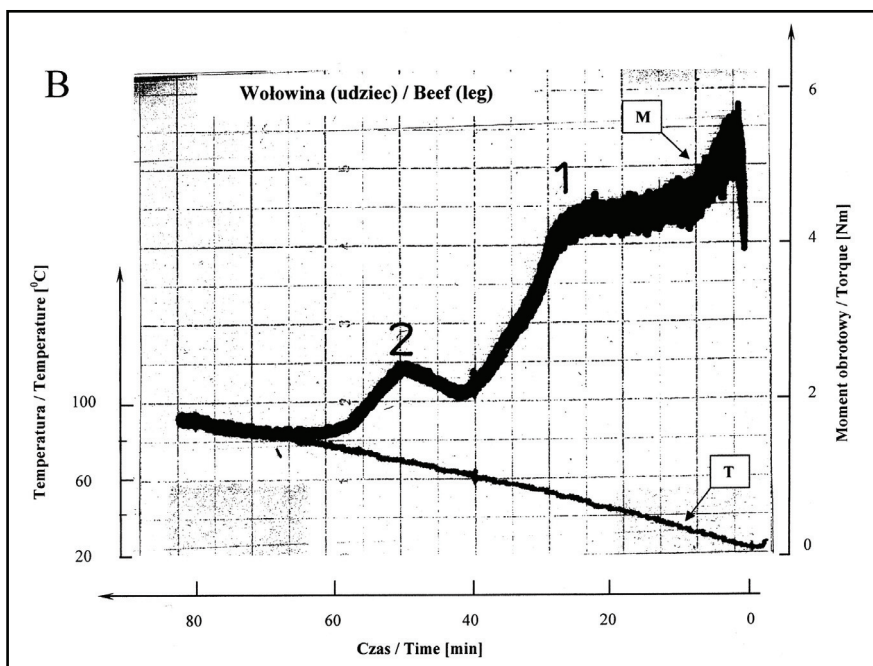
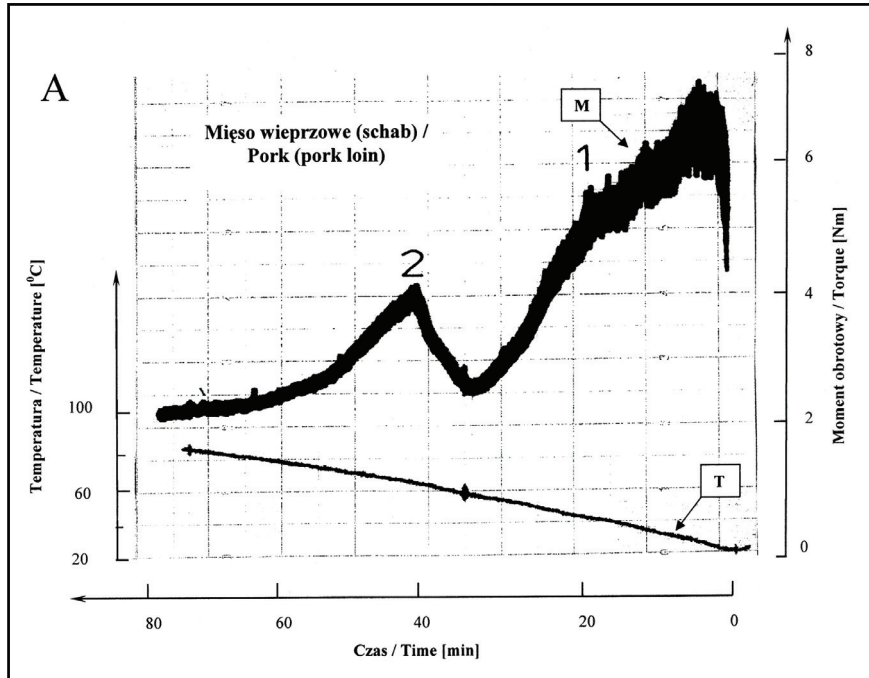
Ogrzewanie mięsa w celu wyznaczenia krzywych termomechanicznych prowadzono wg metody własnej, opisaną wcześniej [9]. Próbę rozdrobnionego mięsa (1000 g) mieszano ze stałą prędkością 66,5 obr./min i ogrzewano w sposób ciągły do temp. ok. 85 °C z szybkością 1 °C/min, w mieszadzie planetarnym typu P 600, stosując zestaw firmy Brabender, (Niemcy) umożliwiający rejestrację temperatury i momentu obrotowego. Temp. początkowa mięsa wynosiła 15 – 18 °C, a końcowa temp. dogrzenia 83 – 85 °C.

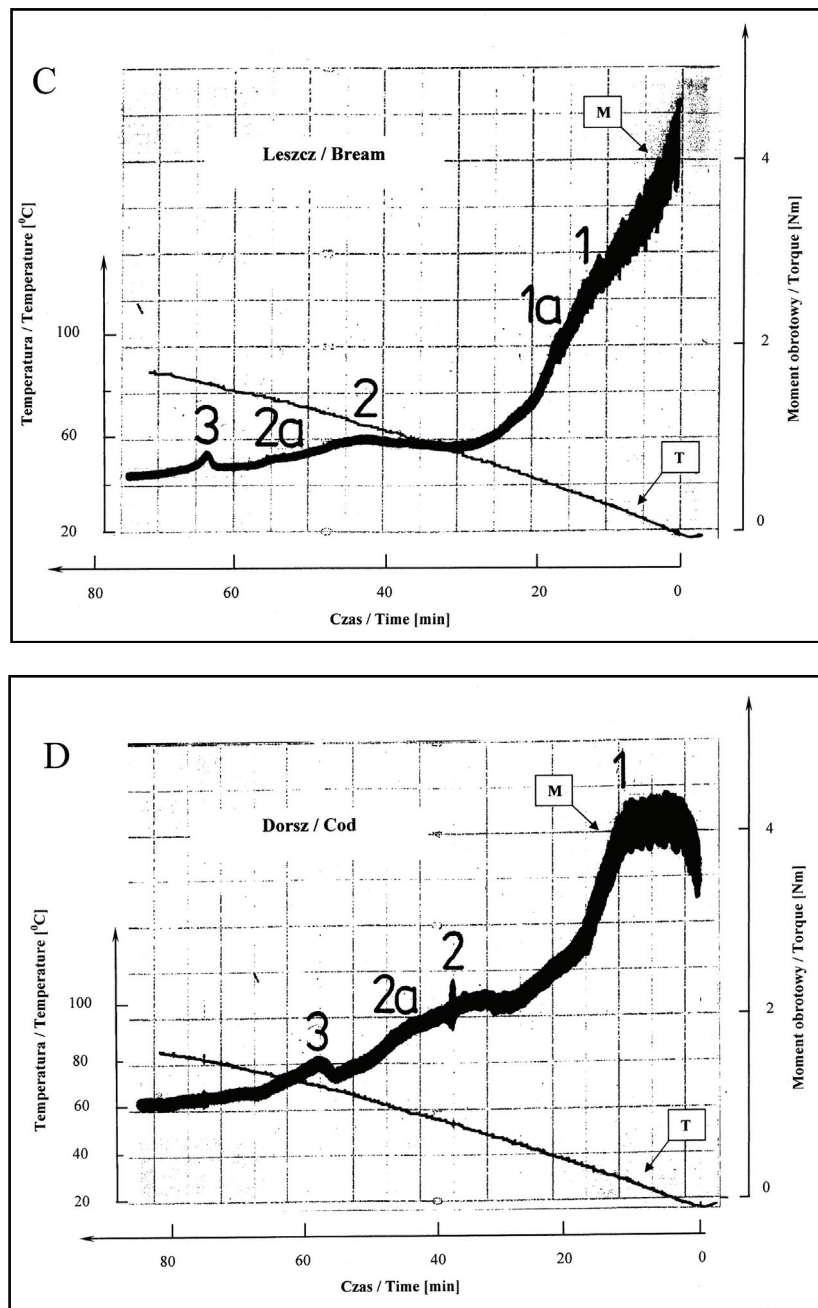
Istotność różnic na poziomie $p < 0,05$ pomiędzy wartościami temperatury denaturacji białek mięśniowych leszcza w zależności od stopnia dojrzałości gonad weryfikowano testem Tukey'a korzystając z programu Statistica 7.0

Wyniki badań i dyskusja

Stosując termomechaniczną metodę ogrzewania mięsa, uzyskano trzy podstawowe piki momentu obrotowego, odpowiadające kolejno: 1. – białkom miofibrilarnym, 2. – białkom sarkoplazmatycznym, 3. – wolnej aktynie (rys. 1).

Zakres temperatury koagulacji frakcji 1., aż do punktu przegięcia krzywej i przejścia we frakcję 2., wynosił w przypadku ryb morskich 26 – 50 °C (dorsz 26 – 43 °C), ryb słodkowodnych 30 – 52 °C, a w przypadku mięsa zwierząt rzeźnych 44 – 54 °C. Ponadto, w obrębie frakcji 1. wyodrębniono podfrakcję 1a, w której temperatura koagulacji mięsa ryb morskich, słodkowodnych i zwierząt rzeźnych mieściła się w zakresie odpowiednio: 36 – 46, 44 – 45 i 50 – 54 °C. Wyznaczone zakresy temperatury koagulacji frakcji 1. są bardzo zbliżone z wartościami temperatury koagulacji białek mięsa ryb, oznaczonymi metodą DSC [4, 13].





Rys. 1. Zmiany momentu obrotowego mieszadła (M) podczas ogrzewania (T) rozdrobnionego mięsa. (A- mięso wieprzowe (schab), B- wołowina (udziec), C- leszcz, D- dorsz).

Fig. 1. Changes in the mixer torque (M) while heating up (T) the minced meat. (A- pork (pork loin), B- beef (leg), C- bream, D- cod).

Temperatura koagulacji frakcji 2. mięsa ryb morskich, słodkowodnych i zwierząt rzeźnych mieściła się w zakresie, odpowiednio: 47 – 78, 60 – 77 i 61-76 °C, a maksimum pików przypadało w obszarze, odpowiednio: 47 – 55, 60 – 64 i 61 – 64 °C. Oznacza to, że podstawowe białka frakcji 2. koagulowały stosunkowo szybko, natomiast białka bardziej termooporne powodowały wydłużenie piku, czyli zakresu temperatury koagulacji. Wynikało to prawdopodobnie z dużej złożoności białek frakcji 2., która zawierała od 50 do 100 białek o bardzo zróżnicowanej masie cząsteczkowej ($20 \cdot 10^3$ – $100 \cdot 10^3$ Da) i punkcie izoelektrycznym pomiędzy pH 6,0 i 7,0 [6, 12]. Uddin i wsp. [17] wykazali, że podczas ogrzewania najtrudniej koagulującą frakcją białek sarkoplazmatycznych mięsa marlina była dehydrogenaza mleczanowa; jej strącanie następowało dopiero w temp. 67 °C.

Cały przedział temperaturowy, jak i zakres odpowiadający maksimum koagulacji frakcji 2. ryb słodkowodnych i zwierząt rzeźnych były zbliżone. Natomiast białka mięśni ryb morskich tej frakcji, a szczególnie dorsza, koagulowały w zakresie niższym o ok. 10 °C niż białka mięsa wieprzowego i wołowego. Prawdopodobnie jest to związane z niską temperaturą środowiska, w którym przebywają głębinowe ryby morskie [14]. Pewien wpływ na niższą temperaturę koagulacji tej frakcji mięsa dorsza może mieć również mała w nim zawartość tłuszczu. Działanie ochronne triacylogliceroli na denaturację cieplną białek jest znane w piśmiennictwie naukowym [15].

Tabela 1

Wartości temperatury denaturacji frakcji białek mięśniowych leszcza determinowane stopniem dojrzałości gonad.

Temperature values of denaturation of bream muscle protein fractions as determined by the gonad maturity index.

Partia ryb Fish sample	Data połowu Date of catch	Stopień dojrzałości gonad Gonad maturity index	Temperatura denaturacji frakcji białkowych [°C] Coagulation temperature of protein fractions [°C]							
			1	1a	Tpp	2	2a	2b	tpp	3
A	03 II	III	30 ^{CD*}	41	50	60	-	-	74 ^B	75 ^B
B	08 III	III - IV	30 ^{CD}	41	52 ^D	60	65	70	77 ^A	79 ^{AD}
C	28 III	IV - V	33 ^{ABD}	41	52 ^D	62	-	72	76	-
D	11 V	VI, VII, II	36 ^{ABC}	41	49 ^{BC}	60	-	-	75	76 ^B

Objaśnienia / Explanatory notes:

- różnice między partiami ryb statystycznie istotne na poziomie $p < 0,05$ / differences among fish samples that are statistically significant at $p < 0,05$; Brak indeksu ^{A,B,C,D} oznacza różnice nieistotne / Values with no ^{A,B,C,D} index mean that the differences are insignificant.

Wpływ stopnia dojrzałości gonad na temperaturę koagulacji frakcji białkowych mięsa ryb zbadano na leszczu, odłowionym w okresie przedtarłowym (partie A, B, C) i na początku okresu tarłowego (D). Wykazano, że pomimo znacznych różnic, szczególnie u samic, we wskaźnikach SDG i GSI, temperatura koagulacji frakcji białkowych nie różniła się istotnie (tab. 1), natomiast w okresie tarła znacznie zmalała wielkość piku drugiej frakcji. Może to świadczyć o mniejszej ekstraktywności białek mięśniowych leszcza w okresie tarła [1]. Nie miało to jednak istotnego wpływu na zakresy temperatury koagulacji białek mięśniowych pod wpływem ogrzewania.

Tabela 2

Zakresy temperatury i średnie wartości temperatury denaturacji poszczególnych frakcji białek mięsa ryb morskich, ryb słodkowodnych i zwierząt rzeźnych.

Temperature ranges and average values of coagulation temperatures of protein fractions of fish and slaughter animal-derived meat.

Frakcja (pik) Fraction (peak)	Temperatura [°C] Temperature [°C]		
	Ryby morskie Saltwater fish	Ryby słodkowodne Freshwater fish	Zwierzęta rzeźne Slaughter animals
1	26 ÷ 36	30 ÷ 36	44 ÷ 46
	32 ± 5,3	32 ± 2,9	45 ± 1,4
1a	36 ÷ 46	41 ÷ 45	50 ÷ 54
	41 ± 5,0	42 ± 1,5	52 ± 2,8
T _{PP 1,2}	43 ÷ 50	49 ÷ 52	54 ÷ 58
	48 ± 4,0	51 ± 1,2	56 ± 2,8
2	47 ÷ 55	60 ÷ 64	61 ÷ 64
	52 ± 4,6	61 ± 1,8	63 ± 2,1
2a	55 ÷ 61	64 ÷ 65	ok. 64
	59 ± 3,5	65 ± 0,7	-
2b	63 ÷ 74	70 ÷ 73	ok. 71
	70 ± 6,1	71 ± 1,0	-
T _{PP 2,3}	64 ÷ 78	73 ÷ 77	71 ÷ 76
	73 ± 7,6	75 ± 1,6	74 ± 3,5
3	ok. 66	74 ÷ 80	=
	-	77 ± 2,4	

Objaśnienie / Explanatory note:

T_{pp} – temp. punktu przegięcia / inflection point temperature.

Frakcja 3. występowała tylko w mięsie ryb słodkowodnych oraz dorsza pobranego do badań w okresie „pre-rigor-mortis”. Pośrednio, potwierdza to jej identyfikację jako aktyny. W większości prób frakcja ta nie występowała lub tworzyła bardzo mały

pik, co może świadczyć, że aktyna jest szybko włączana w okresie pośmiertnym w kompleks aktomiozynowy. Przedstawione wartości uśrednione (tab. 2) świadczą, że graniczna temperatura koagulacji wszystkich białek mięśniowych wynosiła ok. 77 °C niezależnie od rodzaju surowca.

Pomijając sporadycznie występującą frakcję 3., można przyjąć, że graniczna temperatura koagulacji białek mięśniowych ryb morskich, ryb słodkowodnych i zwierząt rzeźnych wyniosła, odpowiednio ok. 73, 75 i 74 °C. W celu pełnego skoagulowania wszystkich białek miofibrylarnych (frakcja 1.) w okresie „post-rigor-mortis” niezbędna temperatura dogrzenia mięsa ryb morskich wyniosła ok. 48 °C, ryb słodkowodnych ok. 51 °C, a zwierząt rzeźnych ok. 56 °C. Wartości te są o kilka stopni niższe od temperatur wyznaczonych metodą denaturacji frakcjonowanej białek soków tkankowych mięsa ryb, rozpuszczalnych w 0,9 % roztworze chlorku sodu [10, 11]. Może to świadczyć, że temperatura denaturacji białek rozpuszczonych w roztworze soli jest nieco wyższa niż białek ogrzewanych bezpośrednio w mięsie. Fakt ten przemawia na korzyść metody termomechanicznej, jako bardziej dokładnej. Ponadto metoda ta pozwala wyznaczyć także czas ogrzewania niezbędny do pełnego zdenaturowania danej grupy białek (rys. 1).

Wnioski

1. Analiza krzywych termomechanicznych, uzyskanych na podstawie pomiaru momentu obrotowego podczas dogrzewania próbek rozdrobnionego mięsa do temp. ok. 85 °C, umożliwiła wyznaczenie zakresu temperatury koagulacji przynajmniej trzech frakcji białek mięśniowych: miofibrylarnych, sarkoplazmatycznych i wolnej aktyny oraz końcowej temperatury dogrzenia, niezbędnej do zdenaturowania wszystkich białek.
2. Graniczna temperatura koagulacji wszystkich białek mięśniowych badanych ryb i zwierząt rzeźnych wyniosła ok. 77 °C.
3. Graniczna temperatura koagulacji białek mięśniowych, z pominięciem sporadycznie występującej frakcji 3. (wolna aktyna), wyniosła: ok. 73 °C w przypadku ryb morskich, ok. 75 °C ryb słodkowodnych i ok. 74 °C w przypadku zwierząt rzeźnych.
4. Koagulacja białek miofibrylarnych (frakcja 1.) nastąpiła po dogrzeniu mięsa do temperatury: ryby morskie ok. 48 °C, ryby słodkowodne ok. 51 °C i zwierzęta rzeźne ok. 56 °C.
5. Okres tarła ryb nie miał istotnego wpływu na zakresy temperatury koagulacji poszczególnych frakcji białkowych, natomiast spowodował zmniejszenie wielkości pików, szczególnie frakcji 2.

Literatura

- [1] Bortnowska G., Kołakowski E.: Sezonowe zmiany rozpuszczalności białek mięśniowych leszcza. Mat. XXIV Konf. Nauk. KTiChŻ PAN „Jakość żywności – uwarunkowania surowcowe i technologiczne”, Wrocław 29-30 czerwca 1993, LC.2,87.
- [2] Connell J.J.: Changes in the actin of cod flesh during storage at -14°C . J. Sci. Food Agric., 1960, **11**, 515-519.
- [3] Connell J.J.: The relative stabilities of the skeletal muscle of some animals. Biochem. J., 1961, **80**, 503-509.
- [4] Davies J.R., Bradsley R.G., Leward D.A., Poulter R.G.: Myosin thermal stability in fish muscle. J. Sci. Food Agric., 1988, **45**, 61-68.
- [5] Jahnston I.A.: Temperature adaptation in myosin of Antarctic fish. Nature, 1975, **254**, 74-75.
- [6] Kijowski J.: Muscle proteins. In: Chemical & Functional Properties of Food Proteins, Ed. by Z.E. Sikorski, Technomic Publ. Co., Inc., Lancaster. Basel 2001, Chapt. 10, pp. 233-269.
- [7] Kołakowski E.: Technologia farszów rybnych. PWN, Warszawa 1986.
- [8] Kołakowski E.: Wstępne obróbki cieplne w technologii konserw rybnych. Informator dla przedsiębiorców. AR w Szczecinie, Szczecin 2007.
- [9] Kołakowski E., Wianecki M.: Thermal denaturation and aggregation of protein in minced fish as studied by thermomechanical method. J. Food Sci., 1990, **55**, 1477-1479.
- [10] Markowski B.: Charakterystyka technologiczna ostroboka i możliwości jego wykorzystania. Zesz. Centr. Lab. Przem. Rybn., 1967, **XV** (7), 1-104.
- [11] Markowski B., Sokołowska A., Wilska S.: Kinetyka zmian tkanki rybnej podczas obróbki cieplnej. I. Zmiany soków tkankowych. Zesz. Centr. Lab. Przem. Rybn., 1971, **XIX** (14), 1971, 5-88.
- [12] Morrissey P.A., Mulvihill D.M., O'Neill E.M.: Functional properties of muscle proteins. In: Developments in Food Proteins – 5, Ed. by B.J.F. Hudson, Elsevier Appl. Sci., 1982, Chapt. 5, pp. 195-256.
- [13] Ogawa M., Tamiya T., Tsuchiya T.: Structural changes of carp myosin during heating. Fisheries Science, 1994, **60**, 723-727.
- [14] Sikorski Z.E.: Technologia żywności pochodzenia morskiego, WNT, Warszawa 1980.
- [15] Stodolnik L., Gabryszak J.: Wpływ związków lipidowych, produktów ich hydrolizy i utleniania, na białka tkanki mięśniowej dorsza bałtyckiego (*Gadus morhua*). Przem. Spoż., 1984, **38** (1), 21-22.
- [16] Uddin M., Ishizaki S., Ishida M., Tanaka M.: Assessing the end-point temperature of heated fish and shellfish meats. Fisheries Science, 2002, **68**, 768-775.
- [17] Uddin M., Ishizaki S., Tanaka M.: Coagulation test for determining end-point temperature of heated blue marlin meat. Fisheries Science, 2000, **66**, 153-160.

THERMAL COAGULATION TEMPERATURE OF MUSCLE PROTEINS IN FISH AND SLAUGHTER ANIMALS FROM SOME SELECTED SPECIES

Summary

Using an already developed thermo-mechanical method, temperature ranges were determined of thermal coagulation of myofibrillar and sarcoplasmic meat proteins. Those proteins as indicated in the first sentence were determined in meat of 5 fish species (12 samples of raw material) and in beef and pork [9]. Moreover, a limiting temperature of denaturation of all muscle proteins was determined. Temperatures necessary to heat up meat (ca. 77°C) so as to get complete denaturation of all the meat proteins were simi-

lar. However, despite this fact, it was proved that the temperature of complete coagulation of myofibrillar proteins (without free actin that sporadically occurred in the samples tested) varied and was ca. 48°C as for saltwater fish, ca. 51°C as for freshwater fish, and ca. 56°C as for slaughter animal meat. The period of fish spawning produced no significant effect on the temperature range of individual protein fractions coagulation, but it depressed peaks of the sarcoplasmic protein fraction.

Key words: temperature, denaturation, meat, fish, slaughter animals ☒