На правах рукописи

УСАНОВА ОКСАНА ЕВГЕНЬЕВНА

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СВИНИНЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Специальность 05.18.04 - технология мясных, молочных, рыбных продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук

Москва 2011

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии)

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Чернуха Ирина Михайловна

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Кудряшов Леонид Сергеевич

доктор ветеринарных наук, доцент
Кальницкая Оксана Ивановна

Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится « 21 » июня 2011 г. в 13 ч. 00 мин на заседании диссертационного совета ДМ 006.021.01 при ГНУ ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИМП

Автореферат разослан и размещен на сайте
www.vniimp.ru « 16 » марта 2011 г.

Отзывы в двух экземплярах присылать по адресу:
109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.т.н. А.Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы:

Многие свойства мяса определяются изменениями, происходящими в белках. Это и формирование нежности, и вкуса, ВСС. В настоящее время мясоперерабатывающая промышленность идет по пути максимального удлинения сроков хранения охлажденного мясного сырья. В связи с этим, ключевым вопросом является возможность определения изменений сырья под действием различных факторов, динамики течения процессов созревания, а также исследования изменений белков мышечной ткани в процессе длительного хранения мяса в различном термическом состоянии.

Сравнительные исследования физико-химических и технологических изменений сырья при различных условиях хранения в настоящее время представляет особый интерес в связи с рядом актуальных проблем: значительного увеличения сроков хранения свинины в охлажденном состоянии, возможности идентификации термического состояния мясного сырья после холодильного хранения, применяемого для производства мясных продуктов и пр. Однако наибольшую сложность представляет определение доли мышечнотканного белка в многокомпонентных мясных продуктах, прошедших термическую обработку.

Определение биохимических изменений белкового состава мясного сырья различного термического состояния, а также определение доли мышечнотканного белка в многокомпонентных термообработанных мясных продуктах, может быть решена с использованием современных электрофоретических методов. Эти методы давно используются в научных исследованиях.

Однако для применения их с целью экспертизы мясного сырья, пищевых продуктов и внедрения в практику экспертных лабораторий необходима разработка и стандартизация оптимальных условий экстракции нативных и коагулированных мышечных белков, а также разработка условий проведения процесса электрофоретического разделения. Это направление весьма перспективно и дает возможность наиболее качественного анализа мясного сырья. Решение этой проблемы имеет научное и практическое значение.

Решение задач, поставленных в работе, основано на трудах таких ученых как Соловьев В.И., Соколов А.А., Пезацки В., Смородинцев И.А., Остерман Л.А., Белоусов А.А., Кудряшов Л.С., Arakawa N., Koohmaraie M.

Целью диссертационной работы является изучение белковых изменений мышечной ткани свинины под действием технологических факторов с использованием электрофоретических методов исследования.

Для достижения поставленной цели были решены следующие ***задачи:***

1. Разработать процедуры пробоподготовки сырья и мясных изделий для разделения нативных и коагулированных мышечных белков, как по массе, так и по изоэлектрической точке (pI);
2. Провести анализ результатов физико-химического, гистологического, микробиологического и электрофоретического методов исследований свинины в процессе длительного хранения в различном термическом состоянии и определить корреляционную зависимость между ними;
3. Изучить состав и свойства мышечных белков, а также закономерности их изменений под действием различных технологических факторов и процессов формирования заданных характеристик качества;
4. Исследовать возможности применения метода 2DE электрофоретического разделения, а также MALDI-картирования высокомолекулярных продуктов протеолиза для определения белкового состава термообработанных мясных изделий на примере вареных колбас;
5. На основе комплексного анализа протекания автолитических процессов и фракционного состава белков термообработанных мясных продуктов разработать методику определения продолжительности хранения свинины в различном термическом состоянии.

Научная новизна работы:

Изучен характер и закономерности количественных и качественных изменений фракций мышечных белков свинины по массе и изоэлектрической точке под воздействием различных технологических факторов (температура, продолжительность хранения, термообработка, тип мышцы);

На основе методов протеомики предложены потенциальные белки-маркеры для идентификации мышечной ткани и прогнозирования срока хранения мясного сырья в зависимости от его термического состояния;

Разработаны математические модели количественной идентификации продолжительности созревания свинины, а также

мышечной ткани термообработанных мясных продуктов - колбаса «Докторская»;

Методом электрофоретического разделения, а также MALDI-картирования высокомолекулярных продуктов протеолиза изучен белковый состав вареной колбасы «Докторская».

Практическая значимость:

- Определена возможность количественного определения доли мышечной ткани в термообработанных мясных продуктах.

Разработаны:

- Методика пробоподготовки и электрофоретическому разделению нативных и коагулированных мышечных белков;
- Методика определения продолжительности хранения свинины в различном термическом состоянии.

Разработанная математическая модель количественного определения мышечной ткани в мясных продуктах позволит значительно снизить долю фальсифицированной мясной продукции.

Уменьшение экономического ущерба путем снижения продаж фальсифицированной продукции в годовом исчислении составляет 1 млн. 80 тыс. рублей в ценах 2010 г.

Апробация работы: Основные результаты выполненных исследований были представлены на 11-ой (2008 г), 12-ой (2009 г) и 13-й (2010 г.) Международных научно-практических конференциях памяти Василия Матвеевича Горбатова, Москва, ВНИИМП; Международной научной конференции студентов и молодых ученых, Москва, ВНИИМП, 2008; 55th International meat industry conference, Belgrade,2009; 55th ICoMST, Copenhagen, Denmark 2009; 56th ICoMST, Jeju, Korea, 2010, Всероссийской научно-практической конференции, Углич, 2010 г.

Публикации: По результатам исследования опубликовано 17 печатных работ, в том числе рекомендованных ВАК – 4.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор научно-технической литературы, характеристику объектов и методов исследования, результаты исследования и их анализ, выводы, список источников использованной литературы и приложения. Содержание работы изложено на 138 страницах машинописного текста, содержит 44 рисунка, 8 таблиц и 2 приложения. Библиография включает 172 источника, в том числе 76 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранного направления исследований, сформулированы научная новизна, практическая ценность работы и направленность исследований.

В главе 1 приведён аналитический обзор научной и технической литературы, посвященной вопросам анализа мышечных белков мяса убойных животных и характера их изменения под действием технологических факторов с использованием современных инструментальных методов исследования. Обоснована необходимость более глубокого рассмотрения вопросов инструментальной оценки мышечных белков мясного сырья и термообработанных пищевых продуктов. Анализ состояния вопроса позволил обосновать цель и сформулировать задачи исследования.

В главе 2 представлена схема проведения экспериментов, дана характеристика объектов и методов исследования.

В главе 3 приведены результаты собственных исследований. В том числе данные сравнительного анализа свинины с использованием методов физико-химического, гистологического и микробиологического исследования в процессе длительного хранения и в различном термическом состоянии Представлены результаты исследования закономерностей формирования заданных качественных показателей при термообработке и хранении свинины. Изложены выводы по выполненной работе.

В приложениях представлены методика определения продолжительности хранения свинины в различном термическом состоянии, а также расчет экономической эффективности контроля количества мышечной ткани мясных продуктов и снижения доли фальсифицированной продукции.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение исследований осуществлялось в несколько этапов в соответствии со схемой, представленной на рис.1.

В соответствии с целью и задачами работы объектами исследования являлись:

- мясное сырье:

- общая средняя проба (далее по тексту – осп) по плечелопаточному отрубу - свинина полутуши;

- осп выделенных тазобедренного и плечелопаточного отрубов;

- модельные фаршевые системы;
- колбаса вареная «Докторская» по ГОСТ Р 52196-2003.

Экспериментальные исследования проводили в условиях: лабораторий Биотехнологии мяса, Испытательного центра ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии, Лаборатории изучения белков Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, Лаборатории протеомики Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Череповецкого и Йошкар-Олинского мясокомбинатов. Изучение состава и свойств объектов исследования проводили с использованием следующих методов анализа: - массовая доля белка – по ГОСТ 25011-81 (1);- жира - по ГОСТ 23042-86 (2);- влаги – по ГОСТ 9793-74 (3);-активная кислотность – по ГОСТ Р 51478-99 (4);- переваримость белков «in vitro» - методом А.А. Покровского и И.Д. Ертанова (5);- количественное определение растворимого белка методом Бредфорд (6);-миофибриллярная фрагментация мяса (MFI) (7);- влагосвязывающая способность - методом Грау-Хамма (8);- микроструктура мяса и готовых изделий - гистологический метод по ГОСТ Р 52480-2005 (9);- электронная микроскопия (10);- определение КМАФАнМ – по ГОСТ 10444.15-94 (11);- оценка аромата на приборе VOCmeter (12);- фракционный состав белков методом 1DE электрофореза в модификации Леммли (13);- фракционный состав белков методом 2DE электрофореза в модификации О'Фарелла (14);- фракционный состав белков методом масс-спектрометрии MALDI-TOF (15);- экономическая эффективность (16);- статистическая обработка данных (17).

При проведении лабораторных исследований строго соблюдали правила средних проб. Достоверность всех полученных результатов подтверждали повторностью экспериментов, а также статистической обработкой результатов экспериментальных исследований.

Рис 1. Схема проведения исследований

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методических подходов к отбору, подготовке проб и разделению нативных и коагулированных мышечных белков по массе и изоэлектрической точке электрофоретическим методом

Соблюдение условий проведения электрофореза и предфорезной обработки образцов является обязательным для возможности сравнения электрофореграмм, полученных в разное время. С этой целью в работе был проведен подбор оптимальных условий экстракции белков из нативных образцов мяса и термообработанных мясных продуктов, а также был проведен подбор плотности гелей, которая обеспечивала бы чёткое и воспроизводимое разделение белковых зон нативных и коагулированных мышечных белков.

Для оптимизации процедуры разделения белков методом 1DE электрофореза в модификации Леммли были подобраны буферные растворы для экстракции: - суммарной фракции саркоплазматической и миофибриллярной фракций мышечных белков - 0,01 М трисовый буферный раствор, pH 7.6; - саркоплазматической белковой фракции - фосфатный буферный раствор, pH 7.8; - миофибриллярной белковой фракции - боратные буферные растворы, pH 6.8 и pH 8.6.

Подобраны два режима электрофореза: - для разделения нативных белков -20мА/100 V в течение 1 ч, а затем в течение 2,5 ч 35мА/200 V; - для разделения коагулированных белков -30мА/100 V в течение 0,5-1 ч, а затем в течение 2,5 ч 45-50мА/300 V.

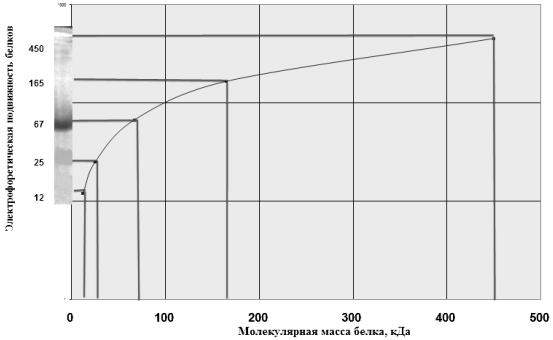


Рис 2. Калибровочная кривая зависимости электрофоретической подвижности белков от десятичного логарифма его молекулярной массы.

В результате проведенных исследований установлено, что для удовлетворительного разделения белков требуется 2,5-3,5 ч. Полученные

белковые зоны идентифицировали и анализировали с помощью калибровочной кривой (рис. 2) зависимости электрофоретической подвижности белков от десятичного логарифма его молекулярной массы. Для построения калибровочной кривой использовали белки-свидетели с известными молекулярными массами.

Разделение белков методом 2DE электрофореза в модификации О'Фарелла осуществляли в 2-х направлениях: изоэлектрофокусирование (ИЭФ), основанное на изоэлектрической точке белков (pI) и SDS-PAGE, основанное на величине молекулярной массы белков (M). Под действием электрического тока происходит миграции белковых молекул в градиенте pH в область со значением pH, равным изоэлектрической точке молекулы. Разделение белков по массе и по изоэлектрической точке дает возможность комплексной оценки фракционного состава исследуемых образцов.

Изучение влияния некоторых технологических параметров на скорость и характер изменения белков мышечной ткани

Изучение влияния способа хранения на характер автолитических процессов. Было проведено изучение автолитических процессов, происходящих в мышцах плечелопаточного отруба выделенного и интактного, оставленного в виде полутуши, а также влияния способа хранения на фракционный состав белков и сроки годности мяса.

Результаты изменения растворимости белков при хранении полутуш и отрубов в подвешенном состоянии без упаковки в условиях холодильной камеры при постоянной температуре 2±2 °С, относительной влажности 85 - 90% и скорости потока воздуха 0,5-1 м/с представлены на рис 3.

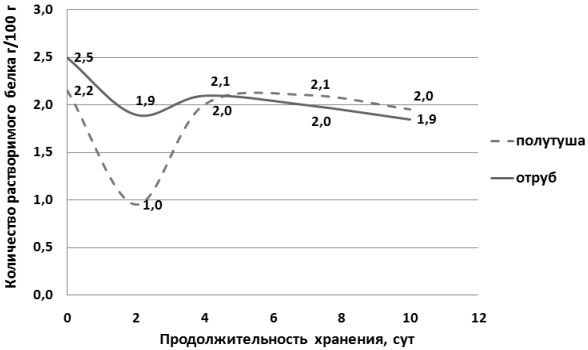


Рис. 3. Динамика изменения общей растворимости белков

Образование нерастворимого актомиозинового комплекса в первые 24 ч после убоя животного характеризуется резким уменьшением

количества растворимых белков мышечной ткани на 55 % в осп по полутуше и 19 % в осп по отрубу по сравнению с исходным показателем в парном мясе.

Анализируя интенсивность послеубойных изменений в полутуше и лопаточном отрубе, следует отметить менее глубокое развитие процесса автолиза в отделенном отрубе, что характеризуется плавным снижением количества растворимого белка на 0,6 г на 100 г продукта, тогда как при хранении полутуш наблюдается резкое снижение (в 2 раза) растворимости белков, что характеризует более глубокие посмертные изменения в тканях. На 4 сут хранения при 2±2 °С количество растворимого белка в полутуше увеличивается и достигает 2,0 г/100 г мяса, приближаясь к таковому значению и для отруба. В дальнейшем, вплоть до окончания эксперимента на 10-е сутки, растворимость белков свинины меняется незначительно как в отрубе, так и в полутуше.

Степень миофибриллярной фрагментации является одним из показателей, характеризующих изменения в структуре мышечной ткани под воздействием различных факторов, и в первую очередь, характеризует течение автолитических процессов.

По мнению ряда авторов (Snyman J.D., Frylinck L.) индекс миофибриллярной фрагментации позволяет более четко охарактеризовать изменения, происходящие в структуре мышечной ткани, поскольку эти процессы напрямую влияют на состояние мышечных белков, MFI также может характеризовать протеомные изменения. Изменения миофибриллярной фрагментации при формировании нежности мяса в процессе хранения на рис. 4.

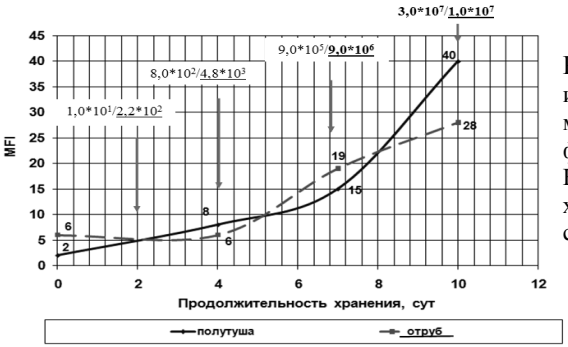


Рис. 4. Динамика изменения показателя миофибриллярной фрагментации (MFI) и КМАФАнМ в процессе хранения охлажденной свинины *

*Через дробь (/) указан показатель КМАФАнМ полутуша/отруб, КМАФАнМ отруба подчеркнуто

Результаты изменения MFI в процессе хранения свинины были проанализированы в совокупности с микробиологическим показателем безопасности – КМАФАнМ.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в образце как отруба, так и полутуши на протяжении срока хранения - 0-10 сут наблюдается плавное нарастание миофибриллярной фрагментации, достигая на 8-е сутки 20-22 ед., соответственно.

Одновременно, в период 4-7 сут в образцах полутуши и отруба происходит резкое увеличение микробиологического показателя на 3 порядка и составляет 9,0 10^5 и 9,0 10^6, соответственно.

Учитывая тот факт, что при значительном нарастании количества микроорганизмов на поверхности полутуши и отруба, в толще мышц величина КМАФАнМ не превышает lg2-2,5 на всем протяжении хранения. Таким образом, мы можем утверждать, что на степень разрушения миофибрилл (т.е., на показатель MFI) оказывают влияние только автолитические процессы, но не процессы, вызванные действием микроорганизмов, что говорит об отсутствии взаимосвязи изменений данных показателей. Следовательно, по изменению показателя MFI можно четко судить о сроке созревания свинины, если КМАФАнМ не превышает 10^8.

С увеличением продолжительности автолиза происходит высвобождение белков (тропонина-Т, миозина, коннектина, небулина, α-актинина) при разрушении мышечных волокон, миофибрилл по Z-линиям. Многие ученые ассоциируют изменения в Z-линии с посмертной тендеризацией мышечной ткани, в результате чего высвобождается множество белков-субфрагментов с молекурными массами 180, 40, 33, 30 и 23 кДа (Davey C.L., Winger R.J.,1991/Tatsumi R.,Takahashi K.,1992).

Электрофореграмма гомогенатов мышечной ткани осп отруба и полутуши на 0,2,4,7,10 суток хранения при 2±2 °С (рис 5), позволила более четко описать изменчивость белковых фракций и установления картины изменений, происходящих в процессе длительного хранения образцов при низких плюсовых температурах.

Анализ общей картины электрофоретического разделения образцов 1 и 2, показал наличие большего количества фракций с молекулярными массами <35 кДа. Особый интерес составлял выявление белка тропонина-Т с молекулярной массой около 30 кДа, который играет значительную роль в развитии нежности мяса и является наиболее характерным белком фрагментации белка мышечного волокна в процессе хранения. Результаты качественного анализа показали почти полное отсутствие фракции

молекулярной массы 30 кДа на 0 сут в образце осп по полутуше, в отличие от образца осп по отрубу. Полученные результаты хорошо коррелируют с изменением показателя MFI.

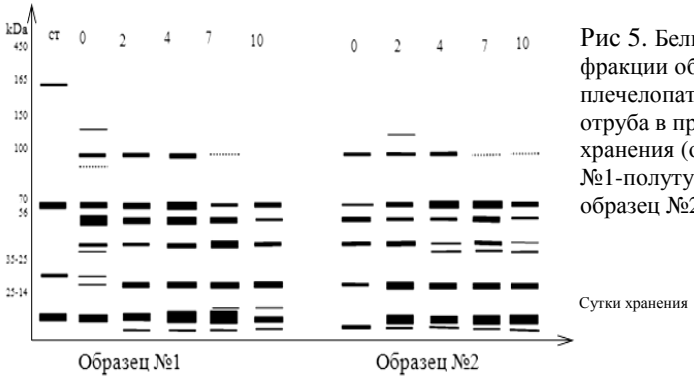


Рис 5. Белковые фракции образцов плечелопаточного отруба в процессе хранения (образец №1-полутуша, образец №2- отруб)

Таким образом, результаты проведенных комплексных исследований позволяют выявить различия в интенсивности автолитических процессов в мышцах в зависимости от способа хранения (в виде отруба или в виде полутуши).

Показано, что, за счет более интенсивного течения автолитических процессов, созревание в свинине при хранении в отрубах завершается на 2 суток раньше, чем в полутуше. При этом микробиологическая порча в отрубах протекают гораздо более интенсивнее, что приводит к сокращению сроков хранения свинины в виде выделенного отруба по сравнению с хранением в полутуше.

Изучение влияния типа мышцы на характер автолитических процессов в отрубах

Проведены биохимические исследования количественного и качественного определения изменений белковых фракций различных типов мышц. Для этого были взяты образцы из разных частей туши – тазобедренный отруб бескостный (ягодичная группа, двуглавая мышца бедра и полусухожильная мышцы) и плечелопаточный отруб бескостный (поверхностная, глубокая, трапециевидная и плечеголовная мышцы).

Количественные изменения растворимого белка мышечной ткани двух отрубов бескостных приведены на рис. 6. Экстрагируемость белков плечелопаточного отруба на этапе 6-12 суток падает, примерно, на 4 %. Это объясняется тем, что экстрагируемость водорастворимых белков буферными растворами с низкой ионной силой резко снижается, что

связано с переходом значительной части растворимых белков в нерастворимое состояние.

В тазобедренном отрубе на этом же этапе (6-12 сут) наблюдается иная картина изменения растворимости белков. Количество растворимого белка увеличивается на 0,5 г/100 г мяса, что составляет 25%, что вероятно связано с продолжающимся процессом созревания, что в свою очередь связано с большей массой тазобедренного отруба, а также более интенсивными нагрузками, которые воздействовали на мышцы при жизни животного.

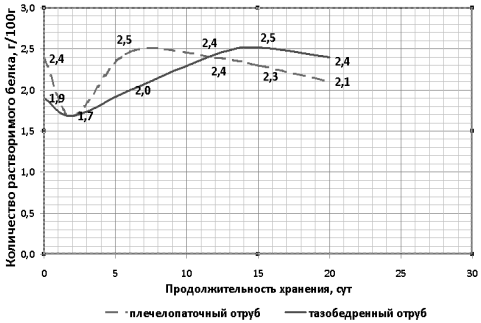


Рис. 6. Динамика изменения количества растворимого белка осп плечелопаточного и тазобедренного отрубов бескостных в процессе хранения

В дальнейшем при хранении в течение 15-20 сут в обоих отрубах экстрагируемость плавно падает и достигает в плечелопаточном и тазобедренном отрубах 2,1 и 2,4 г соответственно растворимого белка в пересчете на 100 г мяса.

Качественный и количественный фракционный состав белков исследуемых образцов показан на гистограмме (рис 7).

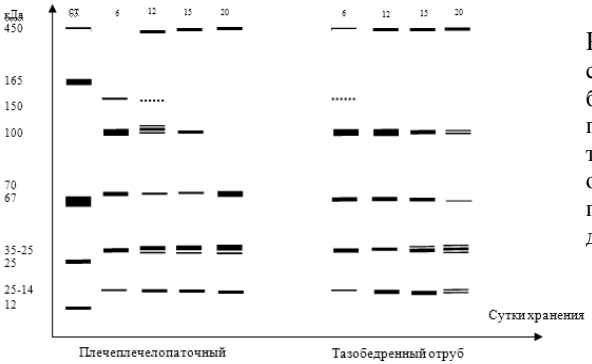


Рис. 7. Фракционный состав мышечных белков плечелопаточного и тазобедренного отрубов бескостных при хранении до 20 суток

Проведенные опыты показали, что число и интенсивность белковых полос, находящихся в области высоких молекулярных масс невелики. Анализируя исследуемые отруба, отмечено почти полное отсутствие к 12 суткам хранения фракции с молекулярной массой 150 кДа в тазобедренном отрубе бескостном. Это связано с распадом тяжелых цепей миозина и ряда белков, прочно связанных с миозиновыми и актиновыми нитями к 12 сут холодильного хранения. В плечелопаточном отрубе процесс распада белковых молекул происходит плавно. Распад фракции с молекулярной массой 150 кДа происходит на этапе 12-20 сут хранения. В обоих отрубах, начиная с 4 суток хранения, выявлены фракции с молекулярными массами 30-37 кДа, что соответствует фракции тропонина-Т. Количественное увеличение данной фракции на 12 сут и 15 сут в плечелопаточном и тазобедренном отрубах, соответственно, говорит об интенсивном распаде миофибрилл, что ведет к увеличению нежности мясного сырья.

В процессе дальнейшего созревания осп исследуемых отрубов происходит расщепление белковых молекул на фрагменты с меньшими молекулярными массами. Процесс интенсивного накопления продуктов распада наблюдается на 15-20 сут хранения для осп обоих отрубов.

Полученные различия подтверждают необходимость дифференцированного подхода к определению сроков годности и оптимального момента завершения процесса созревания мясного сырья в зависимости от типа мышц.

Изучение влияния способа упаковки на характер автолитических процессов в отрубах

Известно, что хранение мяса в вакууме, а значит и при низком парциальном давлении кислорода, либо прекращает, либо замедляет нежелательные процессы. Одновременно хранение в вакууме сопровождается сложным комплексом биохимических и физико-химических процессов, в результате которых мясо в упаковке созревает и приобретает более нежную консистенцию и сочность, становится более доступным действию пищеварительных ферментов. Известно, что наиболее высокие органолептические характеристики имеет мясо при степени вакуумирования 98% (остаточное давление не более 0,02 МПа).

На примере исследования осп плечелопаточного отруба бескостного в неупакованном и упакованном под вакуумом виде описана динамика изменения влагосвязывающей способности исследуемых образцов свинины (ВСС%) в процессе длительного хранения (рис. 8).

Упаковка в значительной степени влияет на характер и скорость автолитических превращений белков. Однако, как видно на графике, влагосвязывающая способность упакованного отруба значительно выше на всех сроках хранения. Влагосвязывающая способность свинины к моменту окоченения достигает минимального значения, и ее величина на 3 % и 14 ниже для упакованного и неупакованного мяса соответственно, чем у свинины через 2 часа после убоя. Такая свинина плохо переваривается пепсином и почти лишена присущей ей в вареном состоянии аромата и вкуса.

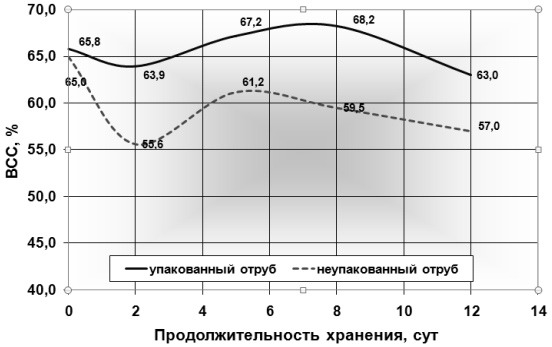


Рис. 8. Динамика изменения ВСС (%) осп упакованного и неупакованного под вакуумом плечелопаточного отруба бескостного

Процесс связывания влаги и распад белковых молекул при созревании отрубов мяса четко взаимосвязан. Как видно из представленных на рис. 8 данных, максимум влагосвязывания неупакованного охлажденного мяса в процессе окоченения и созревания наблюдается на 5 сут хранения и составляет 61,2 %, а к 12 сут хранения ВСС медленно падает в обоих отрубах.

Однако изучение изменений влагосвязывающей способности исследуемых отрубов в совокупности с показателями, характеризующими изменения, происходящие в белковой системе мяса на более длительных сроках хранения, дает возможность дополнить ранее полученные данные.

Изучены изменения саркоплазматической и миофибриллярной фракций белков мышечной ткани. Состояние саркоплазматических белков мышечной ткани не может оказывать непосредственного влияния на изменение нежности мяса при его созревании и дальнейшем хранении. Однако изучение их превращений представляет особый интерес, так как среди этих белков присутствует большое количество тканевых ферментов, которые включаются в биохимические процессы.

Результаты изменений саркоплазматической и миофибриллярной фракций белков при созревании свинины и длительном хранении при низких плюсовых температурах представлены на рис. 9.

Изучение превращений саркоплазматических белков представляет особый интерес, так как среди этих белков присутствуют тканевые ферментов, и благодаря этому, включаются в биохимические процессы, протекающие в мясе.

Рис. 9. Изменения растворимости миофибриллярных и саркоплазматических белков в процессе хранения

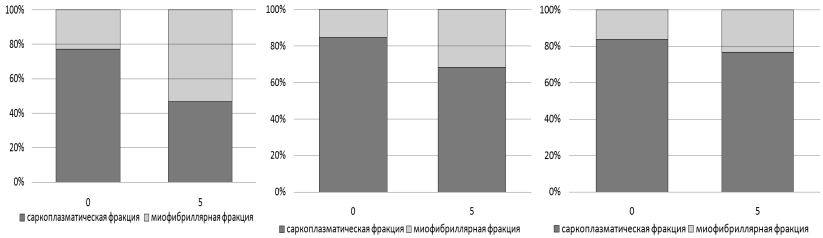
После его охлаждения растворимость белков свинины при хранении в охлажденном состоянии показало, что максимальная растворимость саркоплазматических белков наблюдается у мяса в парном состоянии. При этом уменьшение растворимости наблюдается до 5 сут холодильного хранения, и составляет 60% от исходного значения экстрагируемости белка.

Далее количественное значение растворимости саркоплазматической фракции значительно не меняется и составляет примерно 0,8 г/на 100 г мяса.

Состояние миофибриллярных белков в большей степени определяет важный качественный показатель мяса – нежность. В связи с этим нами было изучение изменение растворимости миофибриллярных белков при созревании мяса, что наиболее важно при длительном его хранении при низких плюсовых температурах.

Изучение влияния замораживания на скорость и характер автолитических процессов

Анализируя процессы, происходящие с белком при длительном хранении мяса в различном термическом состоянии, была установлена картина изменения растворимости белков при хранении мяса в охлажденном (2±2°С) и замороженном (-18±2°С) состоянии (рис 10).



Образцы 1 Образцы 2 Образцы 3

Рис. 10. Изменения фракционного состава саркоплазматической и миофибриллярных фракций белков свинины различного термического состояния: охлажденные образцы 0 и 5 суток хранения при 2±2°С (образцы 1), 1-кратно замороженном состоянии (образцы 2) и 2-кратно замороженном состоянии (образцы 3).

Максимальная растворимость суммарной фракции белков 3,37 г/100 г свойственна охлажденному мясу. Сразу же после его охлаждения растворимость белков снижается на 49%. При этом минимум растворимости белков в охлажденном мясе приходится на 5 сутки и составляет 1,71 г/100 г, что соответствует периоду максимального развития процесса окоченения.

Растворимость белков на 5 сут хранения при низких отрицательных температурах составляет 47% от исходного показателя и процессами разрушения структуры мышечных волокон.

Растворимость белка свинины, оцененная сразу после 2-кратного замораживания, так и через 5 сут возросла на 70% и 189% соответственно, от уровня охлажденного мяса. Выявленные изменения связаны как с биохимическими, так и с физическими разрушениями мышечной ткани при многократном замораживании и из-за воздействия на ткани кристаллов льда. Данные экспериментальных исследований указывают на увеличение растворимости мышечных белков мяса при холодильной обработке, причем наибольшие изменения происходят в саркоплазматических белках.

Показателем характеризующим изменения мясного сырья различного термического состояния может быть MFI (рис. 11).

Показатель MFI дает возможность не только определить продолжительность автолиза, о чем было сказано ранее, но определить термическое состояние мясного сырья как на момент исследования, так и определить, была ли свинина ранее заморожена и сколько раз (одно или

двукратно), но и оценить ранее происходящие процессы – замораживание, размораживание.

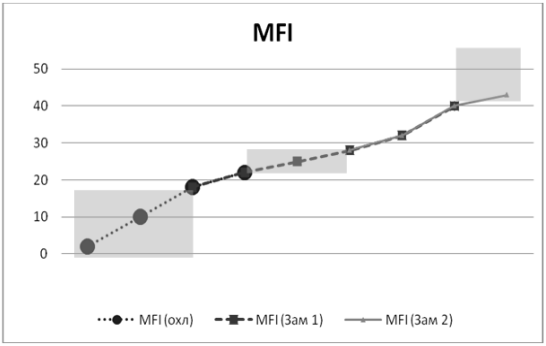


Рис. 11. Изменения показателя миофибриллярной фрагментации (MFI (охл) - охлажденные образцы 0, 5 и 12 суток хранения, MFI (Зам 1) – в 1-кратно замороженном состоянии и MFI (Зам 2) – в 2-кратно замороженном состоянии

В результате анализа изменения данного показателя в процессе хранения (0-12 сут) нами были выделены диапазоны (на рисунке выделены темными участками), характерные для различных термических состояний свинины, такие как:

- с 0 до 17 – охлажденное мясное сырье;
- с 22 до 28 – 1-кратно замороженное мясное сырье;
- с 41 и более - 2-кратно замороженное мясное сырье.

Однако существуют диапазоны MFI, когда нельзя дать 100% оценку термического состояния свинины. В таком случае необходимо проведение комплексных исследований и анализ других показателей.

Разработка математических моделей протекания в свинине автолитических процессов по составу белковых фракций

По результатам проведенных исследований количественного определения растворимого белка были разработаны математические модели, представленные уравнениями регрессии протекания в свинине автолитических процессов под воздействием технологических факторов (табл. 1).

Таблица 1

Математические модели протекания автолитических процессов свинины

Образец	Уравнение регрессии	Стандартные ошибки и коэффициенты корреляции
Плечелопаточный отруб в виде полутуши	$y=1,39+0,45x-0,04x^2$	$S=1,23$ $R^2=0,17$
Плечелопаточный отруб не упакованный	$y=1,63+0,24x-0,02x^2$	$S=0.98$ $R^2=0,30$
Плечелопаточный отруб упакованный под вакуум	$y=1,69+0,3x-0,03x^2$	$S=1,00$ $R^2=0,40$
Тазобедренный отруб не упакованный	$y=1,85+0,58x-0,01x^2$	$S=0,56$ $R^2=0,76$

где x - продолжительность хранения, сут

y – количество растворимого белка, г/100 г

Для каждого уравнения была рассчитана стандартная ошибка и коэффициент корреляции, которые составляют 0,9±0,33 и 0,41±0,21. Разработанные уравнения позволяют определять срок хранения мясного сырья в зависимости от вида отруба и способа его хранения (упаковка, способ хранения, тип отруба).

Изучение характера и закономерности количественных и качественных изменений фракций мышечных белков

Анализируя общую картину электрофоретического исследования мясного сырья различного термического состояния, важным является сравнение изменений количественного содержания белковых фракций на различных сроках хранения. В результате исследований электрофореграмм были выделены диапазоны молекулярных масс белков, являющиеся наиболее показательными. Для анализа выбраны сроки хранения: от 0 сут (парное мясное сырье) до 25 сут хранения при 2±2°С.

Результаты проведенного анализа выявили значительные изменения количества фракций в диапазоне молекулярных масс 56-35 кДа в зависимости от срока хранения мясного сырья. В интервале 5-12 сут созревания наблюдается увеличение количества фракций белков за счет биохимических процессов созревания, разрушения актомиозинового комплекса и выхода белка-актина (молекулярная масса 56 кДа). Дальнейший процесс автолиза ведет к разрушению высокомолекулярных белков и образованию большего числа фракций с молекулярной массой <25 кДа.

Анализ количественного содержания фракции молекулярной массы 56 кДа в зависимости от термического состояния является показательным и важным для его идентификации и что более важно определения многократно размороженного мясного сырья. На всех сроках хранения (0, 5, 12 сут) наблюдается увеличение данной фракции, в 2 раза, а на 12 сут - в 4 раза. Полученные результаты позволяют нам выделить данную фракцию как маркера размораживания свинины.

Изучение фракционного состава белков термообработанных пищевых продуктов и идентификация потенциальных белков-маркеров мышечной ткани

Проводили с 15 образцами модельных фаршей (табл. 2) с добавлением различных растительных компонентов, таких как изолят соевого белка, крахмал картофельный и к-каррагинан GPI 270.

Таблица 2

Состав модельных фаршей

№ образца	Характеристика образца	% замены мышечной ткани
№1	100 % мышечная ткань	-
№2	50 % мышечная ткань + 50 % шпик	50
№3	33 % мышечная ткань + 67 % шпик	67
№4	1 % соевый белок (гидратация 1:4)	5
№5	4 % соевый белок (гидратация 1:4)	20
№6	10 % соевый белок (гидратация 1:4)	50
№7	15 % соевый белок (гидратация 1:4)	75
№8	1 % крахмал картофельный (гидратация 1:6)	7
№9	4 % крахмал картофельный (гидратация 1:6)	28
№10	7 % крахмал картофельный (гидратация 1:6)	50
№11	11 % крахмал картофельный (гидратация 1:6)	77
№12	0,2 % к-каррагинан GPI 270 (гидратация 1:50)	10
№13	0,5 % к-каррагинан GPI 270 (гидратация 1:50)	25
№14	1 % к-каррагинан GPI 270 (гидратация 1:50)	50
№15	1,5 % к-каррагинан GPI 270 (гидратация 1:50)	75

Исследования показали, что в зависимости от состава модельных фаршей, наблюдаются изменения количества растворимого белка (рис. 12).

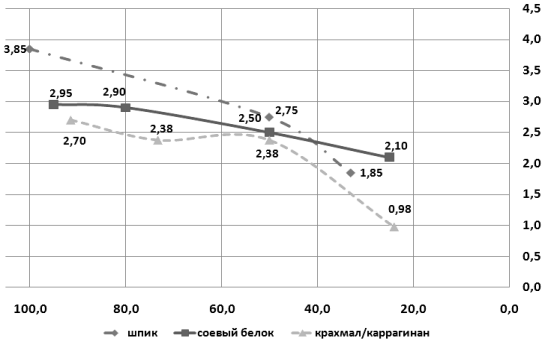


Рис. 12. Зависимость количества растворимого белка от доли мышечной ткани в модельных фаршах.

Добавление 10 % изолята соевого белка снижает уровень растворимого белка до значений сопоставимых со значениями, полученными при 50% замене мышечной ткани шпиком в образце фарша №2. При замене мышечной ткани растительными компонентами более 50% наибольшее влияние на содержание растворимого белка оказывает добавление в фарши крахмала картофельного или к-каррагинана GPI 270, и составляет 0,98 г белка на 100 г фарша (11% и 1,5% соответственно).

При замене мышечной ткани изолятом соевого белка на 67% наблюдаются более высокие количества растворимого белка, составляющие 135% соответствующего при замене шпиком.

Большой научный интерес представляет изучение состава мышечных белков термообработанных мясных продуктов. С этой целью были проведены исследования на образцах колбасы «Докторская» различных производителей. В результате разработаны уравнения регрессии и корреляции для добавок, применяемых в качестве замены мясного сырья (белковый и небелковый компонент).

В соответствии с выведенными уравнениями, определены расчетным путем количества мышечной ткани в образцах, содержащих небелковые компоненты (табл. 3).

Таблица 3

Расчетное количество мышечной ткани

№ образца	Кол-во общ белка,% (х)	Расчетное кол-во мышечной ткани	Результаты гистологического анализа
1	15,36	77,75	крахмал/каррагинан
3	11,5	55,89	крахмал/каррагинан
5	10,35	49,24	крахмал/каррагинан
6	11,08	53,44	крахмал/каррагинан

Дальнейшие исследования термообработанных мясных продуктов заключались в изучении коагулированных мышечных белков методом электрофореза 2DE. Типичная электрофореграмма белков термообработанного продукта, которая была получена при фракционировании образцов методом 2DE электрофореза, представлена на рис. 13. Величины pI белковых фракций определяли по их электрофоретической подвижности.

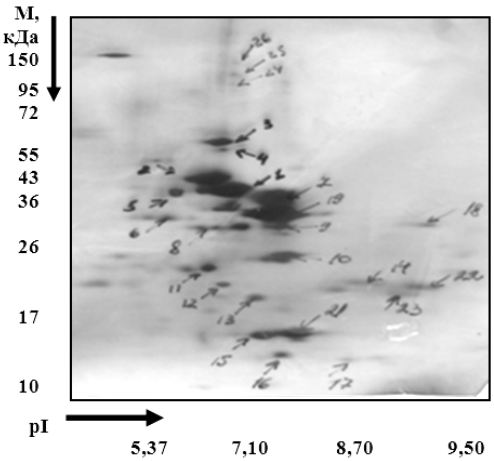


Рис. 13. Результаты электрофоретического фракционирования белков. Стрелками с номерами обозначены белки, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии

Для идентификации мышечной ткани методом масс-спектрометрии с геля были выделены белковые фракции, общие для образцов термообработанных продуктов. В табл. 4 суммированы результаты идентификации белковых фракций. Помимо большого числа тканевых ферментов и белков, всегда присутствующих в мышечной ткани, такие как мышечная креатинкиназа, аденилкиназа, миоглобин, миозин, актин, нами

был идентифицирован тропонин-Т, образующийся в результате распада миофибрилл.

Значения Mw и pI, приведенные в табл. 4, являются средними арифметическими значениями измерений. Для каждого белка был определен процент совпадения, который отражает отношение суммарной длины выявленных пептидов по отношению к аминокислотной последовательности белка. Для каждого идентифицированного белка была проведена оценка вероятности (рис 14), которая определяется как максимальное совпадение пептидной и аминокислотной последовательности соответствующему белку баз данных, где ось абсцисс – процент совпадения, а ось ординат – число совпадений

Таблица 4.

Результаты идентификации белковых фракций 2DE электрофореза

Фракция 2DE	**Mw, kDa/ pI**	**Белок**	**Совпадение, %**
1	43.0/6.61	muscle creatine kinase (pig)	29
7	39.4/8.45	fructose-bisphosphate aldolase A (cattle)	29
8	36.6/8.18	L-lactate dehydrogenase A chain (pig)	34
9	35.7/6.63	dehydrogenase,glyceraldehydephosphate (domestic pig)	46
10	28.7/8.86	phosphoglycerate mutase 2	48
11	26.7/6.54	triosephosphate isomerase 1 (pig)	58
12	21.6/8.38	adenylate kinase isoenzyme 1 (pig)	37
18	29.8/7.74	**troponin T**	22
19	35.7/6.63	dehydrogenase,glyceraldehydephosphate	56
20	29.7/8.39	**troponin T beta isoform**	34
25	43.0/6.77	creatine kinase M-type	31
26	19.0/4.57	**myosin light chain 2**	57
27	43.0/6.61	creatine kinase M-type	47
28	32.8/4.64	unnamed protein product	39
29	20.9/4.9	**myosin light chain 1/3**	66
30	16.9/6.54	chain A, High Resolution X-Ray Structures Of Pig Metmyoglobin And Two Cd3 Mutants Mb(Lys45-> Arg) And Mb(Lys45-> Ser)	84
31	17.0/6.9	**myoglobin**	35
33	43.5/5.94	unnamed protein product	44
34	9.7/8.57	gp80 [Mycobacterium phage KBG]	40
35	59.4/8.99	similar to AGAP005134-PA isoform 1	23
37	39.8/5.24	**actin chain D**	43

Каждая идентифицированная фракция была проанализирована в нескольких базах данных NCBI и Swiss-Prot. Установлена аминокислотная последовательность пептидов, фракции 18. Использованная модификация 2DE не только расширила возможности протеомного анализа мышечных белков термообработанных продуктов, но и позволила выявить белки-

маркеры (тропонин-Т и миоглобин) для количественного определения доли мышечной ткани в мясных продуктах.

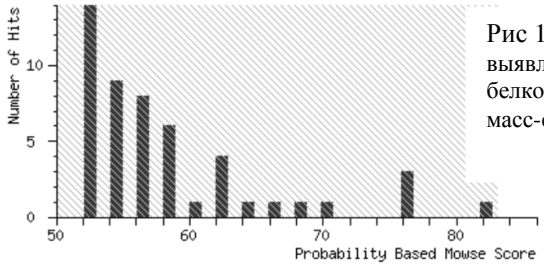


Рис 14. Оценка вероятности выявления и идентификации белковых фракций с помощью масс-спектрометрии

По результатам работы был проведен расчет экономической эффективности применения электрофоретического метода для контроля количества мышечной ткани и снижения фальсификации вареной колбасы, выработанной по ГОСТ Р. Результаты показали, что при проверке 0,3% общего объема выработки в год количество фальсификации снизилось на 20% и составляет не 80% (2009г), а 60% (2010г). При этом ужерб за счет обмана потребителей снижается на 27 млн. руб в год.

ВЫВОДЫ:

1. Отработаны процедуры пробоподготовки и разделения: нативных мышечных белков - подобраны 3-и буферных раствора для экстракции различных фракций белков, а также режимы электрофореза- 20мА/100 V -1 ч и 35мА/200 V-2,5 ч; и коагулированных мышечных белков – буферный раствор с 8М мочевиной;
2. На основе анализа результатов физико-химического, гистологического и микробиологического исследования свинины в процессе длительного хранения и в различном термическом состоянии определена корреляционная зависимость между показателями количества растворимого белка, ВСС, MFI, электрофоретическим разделением и результатами, полученными при исследовании классическими методами исследования;
3. Проведен протеомный анализ мышечных белков. Изучено влияние некоторых технологических параметров на скорость и характер изменения белков мышечной ткани, таких как:

- способ хранения. Хранение сырья в виде отруба, значительно ускоряет автолитические процессы в сравнении с таковым в интактном состоянии (в полутуше). Количество растворимого белка на 2 сут в

полутуше и в отрубе находятся на одном уровне (2,1 г белка/100 г мяса). Максимальное содержание фракции - маркера нежности мяса с молекулярной массой 30 кДа установлено на 7 сут и 4 сут хранения в образцах осп полутуши и отруба, соответственно. Полученные результаты коррелируют с изменением показателя MFI;

- упаковка. Хранение отрубов в упакованном и неупакованном виде четко характеризуется показателем ВСС,%, который во время окоченения достигает минимума, и его величина на 3% и 14% ниже для упакованного и неупакованного сырья, соответственно, чем через 2 ч после убоя;

- тип отруба. Экстрагируемость белков осп по плечелопаточному отрубу на этапе созревания 6-12 суток хранения плавно падает на 16 %. В тазобедренном отрубе на данном этапе созревания наблюдается иная картина изменения фракций растворимых белков - количество растворимого белка увеличивается на 0,5 г/100 г мяса, что составляет 25% Результаты электрофоретического разделения белков исследуемых отрубов показывают полное отсутствие фракции с молекулярной массой 150 кДа в тазобедренном отрубе бескостном, однако в плечелопаточном отрубе процесс распада белковых молекул происходит плавно. Распад фракции с молекулярной массой 150 кДа происходит на этапе 12-20 сут хранения;

- замораживание. Максимальная растворимость суммарной фракции миофибриллярных белков свойственна охлажденному мясу (2±2°С). Сразу же после его охлаждения растворимость белков снижается на 49%. Растворимость белков на 5 сут хранения при низких отрицательных температурах (-18±2°С) составляет 47% от исходного показателя. Растворимость белка свинины, оцененная сразу после 2-кратного замораживания (0 сут), так и через 5 сут возросла на 70% и 189% соответственно, от уровня охлажденного мясного сырья;

4. Изучена возможность применения метода электрофоретического разделения коагулированных мышечных белков 2DE, а также MALDI-картирования высокомолекулярных продуктов протеолиза для анализа фракционного состава белков термообработанных мясных продуктов;

5. Систематизированы и проанализированы результаты комплексного изучения скорости и характера протекания автолитических процессов в свинине в зависимости от различных факторов (тип мышцы, отруб или полутуша, упаковка под вакуумом, охлаждением и размораживание) разработана методика определения продолжительности хранения свинины в различном термическом состоянии.

Опубликованные работы по теме диссертации:

1. Грищенко В.М. Чернуха И.М., Усанова О.Е. Изменения фракционного состава белков свинины в процессе длительного хранения при низких плюсовых температурах//Тенденции и перспективы развития инновационных и информационных технологий мясной промышленности. Сборник докладов 11-й Международной научно-практической конференции памяти Василия Матвеевича Горбатова. - М., 2008, с.168-171;

2. Лисицын А.Б., Чернуха И.М., Грищенко В.М., Усанова О.Е., Борисова Т.Г. Адаптация метода электрофореза для исследования эндогенных биологически активных пептидов в мясном сырье //Тенденции и перспективы развития инновационных и информационных технологий мясной промышленности. Сборник докладов 11-й Международной научно-практической конференции памяти Василия Матвеевича Горбатова. - М., 2008, с. 93-97;

3. Усанова О.Е. Исследование белков мяса методом SDS-электрофореза// Живые системы и биологическая безопасность населения. Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых.- М., 2008, с. 109-111;

4. Chernukha I., Usanova O., Grischenko V. Changes in Fractional Composition of Sarcoplasmic and Myofibrillar Pork Proteins During Long-term Storage at Low Positive Temperatures (-1 to +4C)// 55th International meat industry conference. – Belgrade, 2009, p 137-139;

5. Чернуха И. М., Усанова О. Е Динамика изменения белков свинины в зависимости от вида отруба и срока хранения при низких плюсовых температурах//Живые системы и биологическая безопасность населения. Материал международной научной конференции студентов и молодых ученых.- М.,2009;

6. Чернуха И.М., Усанова О.Е., Лазарев К.В. Физико-химические и технологические изменения свойств свинины при длительном холодильном хранении //Тенденции и перспективы развития инновационных и информационных технологий мясной промышленности. Сборник докладов 12-й Международной научно-практической конференции памяти Василия Матвеевича Горбатова. - М., 2009. – с 247-253.;

7. Chernukha I., Usanova O. Influence of Pork-Shock Modification of Pork on Amino-Acid Composition of Muscle Tissue and Composition of Ecstracted Low Molecular Peptides// 55th International Congress of Meat Science and Technology. – Copengagen, Danmark, 2009;

8. Chernukha I., Usanova O., Grischenko V. Changes in Fractional Composition of Sarcoplasmic and Myofibrillar Pork Proteins in the process of long-term storage at Low Positive Temperatures //Tehnologija mesa,2009, № 3-4, p 223-226;

9. Chernukha I.M., Lisitsyn A.B., Usanova O.E. et al//55th ICoMST. - 2009. - Kopenhagen, Denmark. Proceedings, PE9.29 - P.110-112;

10. Чернуха И.М., Усанова О.Е. Изучение фракционного состава белков охлажденной свинины// Мясная индустрия, 2010, №3, с. 15-18;

11. Чернуха И.М., Усанова О.Е. Физико-химические и технологические изменения свойств свинины при длительном холодильном хранении //Мясные технологии, 2010;

12. Чернуха И.М., Усанова О.Е. Методы идентификации мышечной ткани в мясных продуктах//Вестник РАСХН. – М., 2010. – с 80-82;

13. Юшина Ю.К., Усанова О.Е., Мищенко А.А. Определение белков сои в термически обработанных мясопродуктах методом иммуноферментного анализа//Все о мясе, № 6, 2010, с. 58-59;

14. Чернуха И.М., Усанова О.Е. Изучение изменений белков в процессе хранения свинины в охлажденном, замороженном и многократно размороженном состоянии// Всероссийская научно-практическая конференция, Углич, 2010 г., 2010, с. 297-300;

15. Чернуха И.М., Усанова О.Е., Хвыля С.И. Изучение изменений белков в процессе хранения свинины в различном термическом состоянии// FleischWirtschaft International, Россия - 2/2010, - с.66-68;

16. Chernukha I.M. Modification of meat raw materials by manipulation with animals / Chernuha I.M., Fedulova L.V., Motylina N.S., Makarenko A.N., Usanova O.E. // 56th ICoMST, August, 2010, Jeju, Korea, B022. P. 72

17. Чернуха И.М., Усанова О.Е. Изучение показателей фракционного состава белков с целью возможности идентификации сырья //Тенденции и перспективы развития инновационных и информационных технологий мясной промышленности. Сборник докладов 13-й Международной научно-практической конференции памяти Василия Матвеевича Горбатова. - М., 2010, с. 132-134.

Бум. тип Тираж 80 экз.

ООО "Цифровичок"
117149 Москва, ул. Азовская, 13