Artykuł przeglądowy *Review*

Enzymy występujące w mięsie i ich wrażliwość na wysokie ciśnienie*)

EDYTA MALINOWSKA-PAŃCZYK, ILONA KOŁODZIEJSKA

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I.

Food enzymes and their sensitivity to high pressure

Summary

Changes in the structure enzyme proteins occurring under high pressure can in some cases limit the usefulness of the high pressure technique in the preservation or mild processing of food. However, other changes can be advantageous in forming functional properties of food products. High pressure can affect the activity of proteolytic enzymes of meat by changing their conformation or releasing organelles from the cell and through the increase in concentration of activators or inhibitors in a reaction medium. Changes in enzyme activity, mainly of cathepsins and calpains, caused by high pressure affect the texture of meat. The final effect depends on many factors, primarily on the parameters of pressurization and the post mortem state of meat. The enzymes of coldwater fish are more sensitive to high pressure than their counterparts present in mammal meat or fish living in warm waters. The high pressure causing partial inactivation of oxydoreductases and lipolytic enzymes prevents the deterioration of the sensory quality of the product.

Keywords: high pressure, endogenous enzymes of meat

O możliwości wykorzystania wysokiego ciśnienia w przemyśle żywnościowym decydują dwa czynniki. Pierwszy z nich to zapewnienie skutecznej inaktywacji drobnoustrojów patogennych dla człowieka oraz drobnoustrojów powodujących psucie żywności. Z kolei drugim czynnikiem warunkującym zastosowanie wysokiego ciśnienia jest zachowanie pożądanych cech sensorycznych żywności. Wiadomo, że na ogół związki o małej masie cząsteczkowej, wśród nich substancje zapachowe, barwniki lub biologicznie aktywne cząsteczki, w tym witaminy, pozostają nienaruszone. Z kolei zmiany w strukturze innych składników, jak na przykład w białkach, w tym enzymatycznych, zachodzące pod wpływem działania wysokiego ciśnienia, w niektórych przypadkach mogą ograniczać przydatność tej metody do utrwalania lub łagodnego przetwarzania żywności, natomiast w innych efekt ten może być korzystny w kształtowaniu jej właściwości funkcjonalnych.

W warunkach wysokociśnieniowych zmienia się aktywność endogennych enzymów. W zależności od ciśnienia i temperatury niektóre enzymy mogą zostać aktywowane, inne z kolei inaktywowane, co może wpływać w sposób korzystny lub niekorzystny na teksturę, smakowitość i barwę produktów żywnościowych. Efekty te są zależne od właściwości enzymu, jego pochodzenia, a także warunków środowiska. Dobór parametrów procesu ciśnieniowania powinien zatem uwzględniać również wpływ wysokiego ciśnienia na te składniki produktów żywnościowych. W poniższym krytycznym przeglądzie piśmiennictwa przedstawiono wrażliwość enzymów występujących w mięsie na działanie wysokiego ciśnienia.

Wpływ wysokiego ciśnienia na endogenne enzymy proteolityczne mięsa

Mięso jest źródłem licznych enzymów proteolitycznych. Pełnią one ważną rolę w procesie dojrzewania mięsa zwierząt stałocieplnych. Wskutek ograniczonej i selektywnej enzymatycznej proteolizy w czasie dojrzewania zachodzą zmiany w strukturze mięsa, w białkach tkanki łącznej i w niektórych białkach miofibrylarnych. Fragmentacja miofibryli mięsa zwierząt stałocieplnych jest dodatnio skorelowana z jego kruchością po obróbce cieplnej. W przypadku mięsa ryb degradacja białek miofibrylarnych prowadzi do obniżenia jego jakości (47).

Istnieje kilka teorii dotyczących mechanizmu kruszenia mięsa. Według jednych autorów (11, 21), główną rolę w kruszeniu mięsa odgrywają kalpainy – enzymy, których aktywność zależy od stężenia jonów wapnia w cytozolu. Z kolei Takahashi (48) w swej „wap-

*) Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2007-2010 jako projekt badawczy Nr 1940/B/P01/2007/33.

niowej teorii tenderyzacji" udowadnia, że już sama obecność 0,1 mM jonów wapnia jest wystarczająca, aby zachodziły zmiany w strukturze mięsa, prowadzące do zmniejszenia jego twardości, takie jak: osłabienie linii Z i wiązań pomiędzy aktyną i miozyną oraz fragmentacja włókien titinowych i nebulinowych. Jednakże najbardziej rozpowszechnioną teorią jest ta, w której uważa się, że za ograniczoną hydrolizę białek mięsa *post mortem* odpowiedzialne są dwa systemy proteolityczne: kalpainy oraz katepsyny (15, 35).

Traktowanie mięsa w stanie *rigor mortis* podwyższonym ciśnieniem powoduje szereg zmian, które prowadzą do przyspieszenia procesu tenderyzacji. Wysokie ciśnienie powoduje uszkodzenia retikulum sarkoplazmatycznego (SR) i mitochondriów, w wyniku czego następuje wyciek jonów wapnia. Wzrost stężenia tych jonów w przestrzeni międzykomórkowej, zgodnie z teorią Takahashi (48), może być przyczyną szybszych przemian podczas dojrzewania mięsa. Jednocześnie wzrost ilości Ca^{2+} i uszkodzenie lizosomów w warunkach ciśnieniowych prowadzi do zwiększenia aktywności, odpowiednio, kalpain i katepsyn, i w konsekwencji również wpływa na proces tenderyzacji mięsa.

Kalpainy

Kalpainy to wewnątrzkomórkowe, obojętne proteinazy, aktywowane jonami wapnia, należące do grupy cysteinowych endopeptydaz. W zależności od optymalnego stężenia jonów wapnia wyróżnia się μ-kalpainy (kalpainy 1), m-kalpainy (kalpainy 2) oraz μ/m-kalpainy. Dwie pierwsze znajdują się w komórkach mięśniowych wszystkich kręgowców, natomiast μ/m-kalpainy występują jedynie w mięśniach drobiu (41). Stężenie jonów wapnia, przy którym zachodzi aktywacja m-kalpain wynosi 1-2 mM, natomiast μ-kalpainy wymagają do tego celu jedynie 10-40 μM Ca^{2+}. Do kalpain zalicza się także inne homologii kalpain 1 i 2, np. proteazę nCI-1 (nazywaną kalpainą 3 lub p94) oraz proteazę nCI-2 (tzw. kalpainę 4). Kalpainy hydrolizują tropiomiozynę, troponinę T, troponinę I, białko C, konektynę i desminę, filaminę, titinę, desminę, wikulinę i gelsolinę oraz ciężkie łańcuchy miozyny (14, 46).

Aktywność kalpain w mięsie regulowana jest przez kalpastatynę – ich specyficzny inhibitor, obecny we wszystkich kompartmentach komórek (40). Wyróżnia się dwie izoformy kalpastatyny: 1 i 2, które hamują aktywność, odpowiednio, μ-kalpain i m-kalpain. Prawdopodobnie kalpastatyna 1 jest formą zdefosforylowaną, natomiast kalpastatyna 2 ufosforylowaną. Aktywacja kalpain następuje w wyniku ich autolizy. Kalpastatyna zapobiega temu procesowi, hamując w ten sposób katalityczną aktywność autolizowanych kalpain oraz współzawodniczy z tym białkiem podczas jego łączenia z błoną komórkową w obecności fizjologicznego stężenia jonów wapnia. Kalpainy znajdują się w mięśniu w cytoplazmie i błonach komórkowych. m-Kalpainy w większości zlokalizowane są w cytozolu, podczas gdy μ-kalpainy związane są w 70% z miofibrylami (40). W ten sposób μ-kalpainy mają lepszy dostęp do substratu i są bardziej odporne na hamujące działanie kalpastatyny (5). Chéret i wsp. (10) wykazali, że aktywność kalpain jest porównywalna w mięsie okonia i bydlęcym, natomiast aktywność kalpastatyny jest ok. 4 razy większa w mięsie ryby niż w mięsie bydlęcym. Wg autorów jest to główną przyczyną większego zaangażowania kalpain w proteolizę białek mięsa bydlęcego *post mortem* niż białek ryb.

Wpływ wysokiego ciśnienia na aktywność kalpain zależy od jego wielkości, a także od zmian, jakie zachodzą w tych warunkach w aktywności kalpastatyny i w białkach tkanki mięśniowej. W umiarkowanych ciśnieniach (100-150 MPa) ogólna aktywność kalpain w mięsie okonia i królika praktycznie nie zmienia się (9, 14). Stwierdzono natomiast, że w tych warunkach następuje modyfikacja struktury białek miofibrylarnych, przez co zwiększa się ich podatność na enzymatyczną hydrolizę. Podczas przechowywania przez 2 dni ciśnieniowanego mięsa okonia w warunkach chłodniczych aktywność tych enzymów zwiększa się, a następnie podczas dalszego przechowywania obniża się. Według Chéret i wsp. (8), ten początkowy wzrost aktywności kalpain może być spowodowany uwolnieniem jonów wapnia z SR i mitochondriów po ciśnieniowaniu. Spadek aktywności podczas dalszego przechowywania następuje prawdopodobnie w wyniku ich autolizy spowodowanej ciągłym wzrostem stężenia jonów wapnia w cytozolu. Traktowanie mięsa okonia wyższym ciśnieniem – 300 MPa – powoduje drastyczne zmniejszenie aktywności kalpain bezpośrednio po zakończonym procesie ciśnieniowania, o ok. 70% (8). Podobny efekt wywiera ciśnienie na kalpainy znajdujące się w mięsie królika (14) i łososia (23).

Wyizolowane z mięśni królika i częściowo oczyszczone μ-kalpainy są bardziej wrażliwe na działanie ciśnienia w porównaniu z enzymami traktowanymi ciśnieniem w mięsie. Aktywność μ-kalpain w ekstrakcie spada gwałtownie już po ciśnieniowaniu w 100 MPa, a całkowita inaktywacja zachodzi po traktowaniu ciśnieniem 200 MPa. Z kolei aktywność izolowanych i częściowo oczyszczonych m-kalpain pozostaje niezmieniona po działaniu ciśnienia 200 MPa, natomiast ciśnienie 300 MPa powoduje obniżenie ich aktywności o 90% (14).

Ciśnienie wpływa również na aktywność kalpastatyny. Według Homma i wsp. (14), kalpastatyna w mięśniach królika wykazuje większą wrażliwość na inaktywację niż kalpainy, gdyż w wyniku działania ciśnienia 100 MPa zachowuje jedynie 40% swojej pierwotnej aktywności, a jej całkowita inaktywacja zachodzi już przy ciśnieniu 200 MPa. Prawdopodobnie aktywność kalpastatyny nie zmniejsza się tylko wskutek jej degradacji wywołanej wysokim ciśnieniem, ale również poprzez jej rozkład przez kalpainy, które w umiarkowanych ciśnieniach są aktywowane poprzez wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu (14).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Katepsyny

Katepsyny to hydrolazy występujące w lizosomach, do których należy 13 różnych egzo- i endopeptydaz. Ze względu na budowę miejsca aktywnego katepsyny można podzielić na proteazy: asparaginowe, cysteinowe, serynowe i metaloproteazy. Po śmierci katepsyny mogą być uwolnione do cytozolu i przestrzeni zewnątrzkomórkowych na skutek uszkodzenia lizosomów, które następuje w wyniku nagłego spadku pH. Większość katepsyn znajdujących się w mięśniach hydrolizuje białka frakcji miofibrylarnej, dlatego, według niektórych autorów, enzymy te biorą udział w procesie dojrzewania mięsa (22, 52). Chociaż dla większości mięśniowych katepsyn optymalne pH występuje w zakresie 3÷4, to mogą one jeszcze wykazywać stosunkowo dużą aktywność w mniej kwaśnym środowisku – pH 5÷7. Efektywność działania poszczególnych katepsyn może być potęgowana w obecności innych enzymów lizosomalnych, co wynika z tego, że jedne katepsyny przygotowują w tkance mięśniowej substraty dla innych. Główne katepsyny tkanki mięśniowej to: katepsyna B, L, H, i D.

Katepsyna D – aspartylowa endoproteaza hydrolizuje wiązania peptydowe między hydrofobowymi resztami aminokwasów w białkach do polipeptydów i dipeptydów. Katepsyna D wyizolowana z tkanki mięśniowej różnych zwierząt różni się m.in. masą cząsteczkową, optymalnym pH oraz wrażliwością na niektóre inhibitory. Zawartość tego enzymu w mięśniach ryb jest ok. 10 razy większa niż w mięśniach zwierząt stałocieplnych (13). Wg Gildberga i wsp. (13), większe stężenie enzymu w mięsie ryb prawdopodobnie wyrównuje jego mniejszą aktywność wynikającą z niższej temperatury ich bytowania. Katepsyna D wykazuje maksymalną aktywność wobec hemoglobiny w środowisku kwaśnym (optymalne pH waha się w granicach 2,5-4,3) i zależy od temperatury (54). Stąd często uważa się, że nie ma ona znaczenia w pośmiertnych zmianach struktury mięsa i białek. Jednakże stwierdzono, że katepsyna D z mięsa bydlęcego wykazuje jeszcze ok. 40÷75% maksymalnej aktywności nawet przy pH 7 w stosunku do białek sarkoplazmatycznych (12). Katepsyna D z tkanki mięśniowej ryb przejawia maksymalną aktywność w zakresie temperatury 40-50°C i w odróżnieniu od homologicznego enzymu z mięsa zwierząt stałocieplnych jest jeszcze aktywna w ok. 20% w 0°C (20).

Według Aoki i Ueno (1), do najaktywniejszych enzymów wśród katepsyn należy katepsyna L – endopeptydaza tiolowa (EC 3.4.22.15). Enzym ten powoduje degradację największej liczby różnych białek miofibrylarnych. Hydrolizuje ciężkie i lekkie łańcuchy miozyny, aktynę, troponinę T, troponinę I, α-aktyninę, titinę, nebulinę (29). Katepsyna L jest aktywna w szerokim zakresie pH od 3,0 do 6,5. (46). Jej aktywność w mięsie ryb jest ok. 4 razy większa niż w mięsie bydlęcym (10).

Katepsyna B (EC 3.4.22.1) należy do grupy proteaz cysteinowych, które wykazują optimum aktywności w pH ok. 6 w temperaturze 55°C (45). Wraz z katepsynami typu L i H bierze udział w procesach degradacji białek podczas katabolizmu komórki (2). W mięsie powoduje ona degradację ciężkich łańcuchów miozyny i jest zdolna do hydrolizy aktyny, nienaruszonych miofibryli i kolagenu. Katepsyny L i B pogarszają jakość surimi z ryb. Enzymy te powodują, że żele stają się mniej twarde. Większą rolę w tym procesie pełni katepsyna L, ponieważ znacznie bardziej degraduje białka tworzące strukturę żelu niż katepsyna B (1, 26).

Katepsyny wykazują zróżnicowaną wrażliwość na działanie wysokiego ciśnienia. Enzymy pochodzące z mięsa ryb bytujących w zimnych wodach są bardziej wrażliwe na wysokie ciśnienie niż ich odpowiedniki znajdujące się mięsie zwierząt lub z ryb bytujących w ciepłych wodach (4). Ciśnienia w zakresie 100-300 MPa zazwyczaj zwiększają aktywność katepsyn mięsa zwierząt stałocieplnych. Jest to wynikiem uwolnienia tych enzymów z lizosomów wskutek uszkodzeń błony lizosomalnej wywołanych działaniem ciśnienia (33). Według większości autorów, katepsyna D pochodząca z różnych źródeł wykazuje największą aktywność wobec hemoglobiny bezpośrednio po działaniu ciśnienia 300 MPa (8, 9, 24). Jung i wsp. (16) wykazali, że aktywność tego enzymu w mięsie bydlęcym nawet po działaniu ciśnienia 520 MPa jest o ok. 3 razy większa niż w mięsie nie traktowanym ciśnieniem. Podczas przechowywania ciśnieniowanego mięsa w warunkach chłodniczych przez 20 dni aktywność katepsyny D zmniejsza się, jednakże jest i tak wyższa niż w mięsie nieciśnieniowanym (17). De Lamballerie-Anton i wsp. (24) wykazali, że działanie ciśnienia od 100 do 500 MPa powoduje, że białka miofibrylarne stają się bardziej podatne na działanie katepsyny D wyizolowanej z mięsa bydlęcego. Największa enzymatyczna hydroliza tych białek następuje po uprzednim traktowaniu ich ciśnieniem 300 MPa. W przypadku, gdy ciśnieniem traktowane są jednocześnie katepsyna D i białka miofibrylarne, największe przemiany następują po ciśnieniowaniu 170 MPa. Przy ciśnieniach wyższych, 300 MPa, hydroliza białek miofibrylarnych zachodzi już w dużo mniejszym stopniu, a przy 500 MPa zostaje całkowicie zatrzymana.

Również katepsyny B i L mięsa okonia są odporne na działanie zwiększonego ciśnienia do 500 MPa i podobnie jak w przypadku katepsyny D ich aktywność zmniejsza się tylko nieznacznie podczas przechowywania w warunkach chłodniczych (8, 9, 43). W przypadku katepsyny C Ashie i Simpson (4) stwierdzili, że enzym ten w mięsie bydlęcym zachowuje całkowicie swoją aktywność po działaniu ciśnienia 300 MPa, natomiast w mięsie tasergala w tych warunkach traci ok. 90% swojej aktywności. Jednakże podczas przechowywania w temp. 4°C aktywność tego enzymu ponownie zwiększała się i po 21 dniach wynosiła ok. 60% aktywności początkowej.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Wpływ wysokiego ciśnienia na inne enzymy mięsa

ATPazy i enzymy związane z rozkładem glikogenu. ATPazy Ca^{2+} to enzymy transportujące jony wapnia z sarkoplazmy do SR w komórkach mięśniowych. Stanowią one 80% białek błonowych SR, które wiąże jony Ca^{2+} w czasie spoczynku mięśni i uwalnia je do sarkoplazmy w chwili dotarcia impulsu nerwowego, wywołując skurcz mięśnia. Ciśnienia rzędu 100-150 MPa (5 minut, 35°C) powodują uszkodzenie błony SR, inaktywację ATPaz, jak również kalsekwestryny, białka regulacyjnego, zdolnego do odwracalnego wiązania dużych ilości jonów wapnia, w różnych mięśniach wielu gatunków zwierząt stałocieplnych, zarówno w stanie *pre-*, jak i *post-rigor*. W przypadku mięśni białych szybko kurczliwych zmiany te są dużo większe niż w przypadku mięśni czerwonych wolno kurczliwych Może to wynikać z faktu, że w normalnych warunkach zarówno ilość SR, jak i aktywność ATPazy Ca^{2+} w mięśniach czerwonych jest dużo niższa niż w mięśniach białych (7).

Miozyna jest białkiem składającym się z sześciu łańcuchów polipeptydowych – dwóch głównych łańcuchów, zwanych ciężkimi oraz czterech lekkich. Dwa główne łańcuchy są zwinięte w części C-końcowej, tworząc strukturę zwaną główką. Główka miozyny jest zdolna do hydrolizy ATP w obecności jonów wapnia. Aktywność ATPazowa miozyny zmniejsza się po traktowaniu wysokim ciśnieniem wskutek zmian zachodzących w konformacji tego białka. Ko i wsp. (19) wykazali, że ciśnienie 100 MPa obniża aktywność ATPazową miozyny pochodzącej z mięsa tilapii o 33%. Po działaniu wyższych ciśnień 150 i 200 MPa, ATPaza wykazywała, odpowiednio, 26% i 12% swojej pierwotnej aktywności.

Traktowanie wysokim ciśnieniem mięśni w stanie *pre-rigor* zwykle prowadzi do szybkiego spadku pH i intensywnego skurczu mięśnia. Wielkość tych zmian zależy od czasu działania ciśnienia, temperatury oraz rodzaju mięśnia. W mięśniach owczych i bydlęcych bezpośrednio po działaniu ciśnienia 100-150 MPa przez 5 minut w temperaturze 35°C zaobserwowano zmniejszenie pH o 0,6-0,8 jednostki. Jednakże po 2 h od zakończenia procesu pH mięsa wracało do wartości początkowej. Gdy ciśnieniowanie trwało dłużej (3-24 h), miało miejsce trwałe obniżenie pH. Takie zmiany pH nie następowały lub były tylko nieznaczne, gdy mięso traktowano ciśnieniem w temperaturze 0°C, nawet podczas procesu trwającego przez 24 h (27).

Spadek pH wywołany działaniem wysokiego ciśnienia w 35°C skorelowany jest z aktywnością enzymów związanych z rozkładem glikogenu: fosforylazą glikogenu, kinazą fosforylazową oraz fosfatazą. Aktywność kinazy fosforylazowej, podobnie jak jej substratu – fosforylazy, jest regulowana w drodze fosforylacji. Enzym ten jest również aktywowany przez jony wapnia, dlatego też w wyniku działania ciśnienia 100 MPa przy 35°C następuje jej natychmiastowa aktywacja na skutek uwolnienia Ca^{2+} z SR. W konsekwencji nieaktywna fosforylaza *b* z łatwością zostaje przekształcona w aktywną formę *a*. Co więcej, pod wpływem działania wysokiego ciśnienia znacząco zmniejsza się aktywność fosfatazy, która odpowiedzialna jest za defosforylację formy *a*. Fosforylaza pozostaje zatem w formie aktywnej i prowadzi rozkład glikogenu do glukozo-1-fosforanu (7). W dalszym etapie procesu glikolizy glukozo-1-fosforan przechodzi w pirogronian, a następnie w mleczan, który gromadząc się w mięśniach, powoduje ich zakwaszenie.

Działanie ciśnienia 150 MPa w temperaturze 0°C na mięśnie nie powoduje znaczącego spadku pH, gdyż w tych warunkach nie następuje skurcz mięśnia, a co za tym idzie – jony wapnia nie zostają uwolnione z SR do sarkoplazmy i kinaza fosforylazowa nie zostaje aktywowana. Zatem fosforylaza *b* nie przekształca się w aktywną formę *a* i pH mięśni pozostaje bez zmian. Dodatkowo enzymy związane z rozkładem glikogenu są bardziej wrażliwe na działanie ciśnienia w temperaturze 0°C niż 35°C (7).

Transglutaminaza. Transglutaminaza (TG) – glutamino γ-glutamylotransferaza – jest endogennym enzymem występującym w mięśniach ryb i krwi zwierząt stałocieplnych oraz w tkankach roślinnych. TG produkowana jest także przez mikroorganizmy: *Streptoverticillum*, a także *Physarum* i *Streptomyces* sp. (18). Handlowe preparaty tego enzymu pozyskuje się właśnie z tych szczepów. Katalizuje on reakcję przeniesienia grupy acylowej pochodzącej z grupy γ-karboksyamidowej reszty glutaminy na cząsteczkę zawierającą pierwszorzędowe grupy aminowe (białka, polipeptydy, wolne aminokwasy) (42).

TG pochodzenia zwierzęcego, w przeciwieństwie do enzymu wytwarzanego przez mikroorganizmy, należy do grupy enzymów Ca^{2+}-zależnych (32). TG zwierzęce wykazują maksymalną aktywność w temperaturze 50-56°C przy pH 6,0-9,5. W przypadku TG pochodzącej z ryb różnych gatunków (np. karpia, leszcza, kulbińca kalifornijskiego, tilapii) optymalna temperatura działania zawiera się w zakresie 30-55°C (51, 53).

Wrażliwość TG na działanie wysokiego ciśnienia zależy od jej pochodzenia. TG pochodząca z mięsa ostroboka (*Trachurus trachurus*) traci 35% aktywności po 15-minutowym działaniu ciśnienia 300 MPa w temperaturze 25°C (30). Natomiast TG mintaja (*Theragra chalcogramma*) jest całkowicie odporna na działanie wysokiego ciśnienia w zakresie 100-300 MPa (3). TG pochodzenia mikrobiologicznego charakteryzuje się jeszcze większą odpornością na działanie wysokich ciśnień. Zastosowanie ciśnienia 600 MPa przez co najmniej 100 minut w temperaturze pokojowej zmniejsza aktywność tego enzymu tylko o 50%. Taki sam efekt w warunkach ciśnienia atmosferycznego uzyskuje się już po 40 minutach ogrzewania w temperaturze 60°C (25). Dodatek transglutaminazy do mięsa traktowanego ciśnieniem indukuje powsta-

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

wanie żeli, które mają bardziej jednolitą strukturę i są bardziej zwarte niż te otrzymane w procesie ciśnieniowania bez udziału enzymu lub w podwyższonej temperaturze (50).

Enzymy lipolityczne mięsa

Znaczny wpływ na właściwości sensoryczne mięsa ryb i zwierząt stałocieplnych mają enzymy, które uczestniczą w przemianach lipidów. W wyniku lipolizy, katalizowanej przez lipazy i fosfolipazy, z tłuszczów i olejów zwierzęcych powstają wolne kwasy tłuszczowe, prowadzące do pogorszenia jakości mięsa. Hydrolityczne przemiany lipidów w mięsie zachodzą nawet w temperaturze poniżej 0°C. Ogrzewanie powoduje częściową inaktywację tych enzymów, dlatego też ich aktywność jest mniejsza w mięsie poddanym obróbce cieplnej w temperaturze 100°C niż w surowym (38).

W mięsie ryb szczególnie aktywne są fosfolipazy, co powoduje, że wolne kwasy tłuszczowe zarówno w rybach lodowanych, jak i zamrożonych gromadzą się wskutek hydrolizy fosfolipidów. Pod koniec dopuszczalnego okresu przechowywania ryb w lodzie ilość kwasów tłuszczowych, uwolnionych w wyniku działania tych enzymów może wzrosnąć nawet do ok. 175 mg/100 g mięsa (49). Wolne kwasy tłuszczowe są podatne na proces utleniania, a ich produkty mogą stać się prekursorami licznych lotnych związków zapachowych, powodujących pogorszenie jakości surowca.

Lipazy wykazują zróżnicowaną wrażliwość na działanie wysokiego ciśnienia. Według Macheboeuf i Basset (28), są one stabilne jeszcze powyżej 1100 MPa, natomiast według Seyderhelma i wsp. (44) inaktywacja tych enzymów zachodzi już po traktowaniu ciśnieniem 600 MPa. W przypadku fosfolipaz zahamowanie ich aktywności w mięsie dorsza następuje już po działaniu ciśnienia powyżej 405 MPa. W wyniku tego podczas przechowywania w ciśnieniowanym mięsie gromadzi się mniej wolnych kwasów tłuszczowych niż w mięsie nie traktowanym ciśnieniem, co zapobiega pogorszeniu się właściwości sensorycznych produktu (34).

Oksydoreduktazy mięsa. Obok hydrolizy w mięsie zachodzą również przemiany nienasyconych kwasów tłuszczowych, spowodowane procesem oksydacji. Lipidy utleniają się w mięśniach ryb w wyniku autooksydacji oraz w procesach enzymatycznych katalizowanych przez lipoksygenazę skrzel i skóry (LOX), peroksydazę krwi i mikrosomalną peroksydazę NADH mięśni. Powstające nadtlenki rozkładają się do kwasów karboksylowych o krótszych łańcuchach, alkoholi, aldehydów, ketonów i węglowodorów. Niektóre z produktów utlenienia wywołują pożądany aromat świeżej ryby, inne powodują nieprzyjemny smak i zapach zepsutych ryb. Endogenna lipoksygenaza katalizuje rozkład barwników karotenoidowych, co prowadzi do zaniku różowej lub czerwonej barwy skóry i mięśni ryb w czasie przechowywania (46).

Przed tymi niekorzystnymi przemianami chronią komórki endogenne enzymy, tj. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza oraz peroksydaza glutationowa (6, 36). W wyniku przemian nienasyconych lipidów wywołanych obecnością tlenu atmosferycznego powstają m.in. szkodliwe anionorodniki ponadtlenkowe, które następnie przekształcane są pod wpływem działania dysmutazy ponadtlenkowej w nadtlenek wodoru. Działa on toksycznie na komórki, dlatego też jego stężenie musi być utrzymywane na bezpiecznym poziomie. Rolę regulatora spełniają tu katalaza i peroksydaza glutationowa, które w kolejnym etapie reakcji rozkładają H_2O_2 do cząsteczki wody (31). Te oksydoreduktazy są aktywne również w mięsie zwierząt *post-mortem* (39) i odgrywają istotną rolę w czasie przechowywania oraz przetwarzania mięsa, zapobiegając m.in. utlenianiu oksymioglobiny do metmioglobiny, prowadzącemu do negatywnych zmian w barwie mięsa. Pod wpływem wysokiej temperatury w mięsie drobiowym aktywność peroksydazy glutationowej i katalazy zmniejsza się, natomiast dysmutaza ponadtlenkowa jest odporna na działanie ogrzewania (37).

W dostępnym piśmiennictwie jest stosunkowo mało danych o wpływie ciśnienia na opisane powyżej enzymy ważne ze względu ma rolę, jaką odgrywają w czasie przetwarzania i przechowywania produktów mięsnych. Serra i wsp. (43) wykazali, że aktywność peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w mięsie peklowanym, a następnie traktowanym wysokim ciśnieniem 600 MPa zmniejszyła się tylko o ok. 7-14%.

Podsumowanie

Endogenne enzymy są ważnym składnikiem żywności wpływającym na jej jakość. Niektóre z nich powodują niekorzystne zmiany, dlatego też podczas przetwarzania i przechowywania żywności powinny być one inaktywowane. Z drugiej strony, niektóre enzymy prowadzą do takich przemian w żywności, które zwiększają jej akceptowalność przez konsumenta oraz stanowią naturalny czynnik zapobiegający rozwojowi mikroorganizmów. Wysokie ciśnienie może w dwojaki sposób oddziaływać na enzymy. Umiarkowane ciśnienia zazwyczaj powodują aktywację i zwiększenie aktywności enzymów. Warunki te mogą zostać wykorzystane np. do przyspieszenia procesu dojrzewania mięsa. Z kolei wykorzystanie wyższego ciśnienia jako metody inaktywującej mikroorganizmy i enzymy jest ograniczone m.in. ze względu na niekorzystne zmiany barwy mięsa.

Wrażliwość enzymów na działanie ciśnienia zależy od ich pochodzenia, składu środowiska oraz jego odczynu. Duże zróżnicowanie w składzie jakościowym i ilościowym surowców i produktów żywnościowych sprawia, iż podczas doboru warunków procesu ciśnieniowania takie parametry, jak wielkość ciśnienia i temperatura muszą zostać dobrane indywidualnie.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Piśmiennictwo

1. *Aoki T., Ueno R.*: Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. Food Res. Int. 1997, 30, 585-591.
2. *Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T.*: Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp (Cyprinus carpio). Comp. Biochem. Physiol. 1997, 117B, 579-587.
3. *Ashie I. N. A., Lanier T. C.*: High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. J. Food Sci. 1999, 64, 704-708.
4. *Ashie I. N. A., Simpson B. K.*: Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. Food Res. Int. 1996, 29, 569-575.
5. *Boehm M. L., Kendall T. L., Thompson V. F., Goll D. E.*: Changes in the calpains and calpastatin during post mortem storage of bovine muscle. J. Animal Sci. 1998, 76, 2415-2434.
6. *Chan K. M., Decker E. A.*: Endogenous skeletal muscle antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1994, 34, 403-426.
7. *Cheftel J. C., Culioli J.*: Effects of high pressure on meat: a review. Meat Sci. 1997, 46, 211-236.
8. *Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M., Verrez-Bagnis V.*: Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. Food Chem. 2007, 101, 1474-1479.
9. *Chéret R., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie-Anton M., Verrez-Bagnis V.*: High-pressure effects on the proteolytic enzymes of sea bass (Dicentrarchus labrax L.) fillets. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 3969-3973.
10. *Chéret R., Hernandez-Andres A., Delbarre-Ladrat C., de Lamballerie M., Verrez-Bagnis V.*: Proteins and proteolytic activity changes during refrigerated storage in sea bass (Dicentrarchus labrax L.) muscle after high-pressure treatment. Eur. Food Res. Technol. 2006, 222, 527-535.
11. *Dransfield E.*: Calpains from thaw rigor muscle. Meat Sci. 1996, 43, 311--320.
12. *Eino M. F., Stanley D. W.*: Catheptic activity, textural properties and surface ultrastructure of post-mortem beef muscle. J. Food Sci. 1973, 38, 45-50.
13. *Gildberg A.*: Aspartic proteinases in fish and aquatic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 1988, 91B, 425-435.
14. *Homma N., Ikeuchi Y., Suzuki A.*: Levels of calpain and calpastatin in meat subjected to high pressure. Meat Sci. 1995, 41, 251-260.
15. *Jiang S. T.*: Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. Food Sci. Agric. Chem. 2000, 2, 55-74.
16. *Jung S., de Lamballerie-Anton M. D., Ghoul M.*: Modifications of ultrastructure and myofibrillar proteins of post-rigor beef treated by high pressure. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 2000, 33, 313-319.
17. *Jung S., Ghoul M., de Lamballerie-Anton M.*: Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 2003, 36, 625-631.
18. *Klein J. D., Guzman E., Kuehn G. D.*: Purification and partial characterization of transglutaminase from Physarum polycephalum. J. Bacteriol. 1992, 174, 2599-2605.
19. *Ko W. C., Jao C. L., Hsu K. C.*: Effect of hydrostatic pressure on molecular conformation of tilapia (Orechromis niloticus) myosin. J. Food Sci. 2003, 68, 1192-1195.
20. *Kołodziejska I., Sikorski Z.*: Proteolityczne enzymy mięsa. I. Charakterystyka i działanie w układach modelowych. Przemysł Spoż. 1984, 43, 11-13.
21. *Koohmaraie M.*: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. Meat Sci. 1996, 43, 193-201.
22. *Koohmaraie M.*: Muscle proteinases and meat aging. Meat Sci. 1994, 36, 93-98.
23. *Lakshmanan R., Patterson M. F., Piggott J. R.*: Effects of high pressure processing on proteolytic enzymes and proteins in cold-smoked salmon during refrigerated storage. Food Chem. 2005, 45, 541-548.
24. *Lamballerie-Anton M. de, Perron J., Chapleau N., Jung-Bourroux S.*: Effect of high pressure on the reaction between bovine myofibrils and cathepsin D. High Pres. Res. 2003, 23, 77-80.
25. *Lauber S., Noack I., Klostermeyer H., Henle T.*: Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. Eur. Food Res. Technol. 2001, 213, 246-247.
26. *Liu H., Yin L., Zhang N., Li S., Ma C.*: Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. Food Chem. 2008, 110, 310-318.
27. *Macfarlane J. J., McKenzie I. J., Turner R. H.*: Pressure-induced pH and length changes in muscle. Meat Sci. 1982, 7, 169-181.
28. *Macheboeuf M. A., Basset J.*: Die Wirkung sehr hoher Drucke auf Enzyme. Ergeb. Enzymforsch. 1934, 3, 303-308.
29. *Matsukura U., Okitani A., Nishimuro T., Kato H.*: Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. Biochim. Biophys. Acta 1981, 66, 241-247.
30. *Montero P., Lopez-Caballero M. E., Perez-Mateos M., Solas M. T., Gomez--Guillen M. C.*: Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. Food Chem. 2005, 90, 751-758.
31. *Morrissey P. A., Sheehy P. J. A., Galvin K., Kerryh J. P., Buckleyh D. J.*: Lipid stability in meat and meat products. Meat Sci. 1998, 49, 73-86.
32. *Motoki M., Seguro K.*: Transglutaminase and its use for food processing. Trends Food Sci. Technol. 1998, 9, 204-210.
33. *Ohmori T., Shigehisa T., Taji S., Hayashi R.*: Biochemical effects of high hydrostatic pressure on the lysosome and proteases involved in it. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992, 56, 1285-1288.
34. *Ohshima T., Nakagawa T., Koizumi C.*: Effect of high pressure in the enzymatic degradation of phospholipids in fish muszle during storage, [w:] Bligh E. G. (ed).: Seafood Science and Technology. Fishing News Books, Oxford 1992, 64-75.
35. *Ouali A.*: Proteolytic and physiological mechanisms involved in meat texture development. Biochimie 1992, 74, 251-265.
36. *Petron M. J., Raes K., Claeys E., Lourenco M., Fremaut D., De Smet S.*: Effect of grazing pastures of different botanical composition on antioxidant enzyme activities and oxidative stability of lamb meat. Meat Sci. 2007, 75, 737-745.
37. *Pradhan A. A., Rhee K. S., Hernandez P.*: Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. Meat Sci. 2000, 54, 385-390.
38. *Refsgaard H. H. F., Brockhoff P. M. B., Jensen B.*: Free polysaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 3280-3285.
39. *Rennere M., Dumont F., Gatellier P.*: Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. Meat Sci. 1996, 43, 111-121.
40. *Sazontova T. G., Matskevich A. A., Arkhipenko Y. V.*: Calpains: physiological and pathophysiological significance. Pathophysiology 1999, 6, 91-102.
41. *Sentandreu M. A., Coulis G., Ouali A.*: Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. Trends Food Sci. Technol. 2002, 13, 398--419.
42. *Serafini-Fracassini D., Del Duca S., Beninati S.*: Plant transglutaminases. Phytochemistry 1995, 40, 355-365.
43. *Serra X., Sarraga C., Grebol N., Guardia M. D., Guerrero L., Gou P., Masoliver P., Gassiot M., Monfort J. M., Arnau J.*: High pressure applied to frozen ham at different process stages. 1. Effect on the final physicochemical parameters and on the antioxidant and proteolytic enzyme activities of dry-cured ham. Meat Sci. 2007, 75, 12-20.
44. *Seyderhelm I., Boguslawski S., Michaelis G., Knorr D.*: Pressure induced inactivation of selected food enzymes. J. Food Sci. 1996, 61, 308-310.
45. *Sharma S., Mittal A., Gupta V. K., Singh H.*: Improved stabilization of microencapsulated cathepsin B in harsh conditions. Enz. Mikrob. Technol. 2007, 40, 337-342.
46. *Sikorski Z. E.*: Białka – budowa i właściwości, [w:] Chemia Żywności. WNT, Warszawa 2002, 278-330.
47. *Stoknes I. S., Walde P. M., Synnes M.*: Proteolytic activity in cod (Gadus morhua) muscle during salt curing. Food Res. Int. 2005, 38, 693-699.
48. *Takahashi K.*: Structural weakening of skeletal muscle tissue during post--mortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. Meat Sci. 1996, 43, S67-S80.
49. *Toldra F.*: Proteolysis and lipolysis in flavor development of dry-cured meat products. Meat Sci. 1998, 49, 101-110.
50. *Trespalacios P., Pla R.*: Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. Food Chem. 2007, 100, 264-272.
51. *Tsukamasa Y., Miyake Y., Ando M., Makinodan Y.*: Toatal activity of transglutaminase at various temperatures in several fish meats. Fish Sci. 2002, 68, 929-933.
52. *Whipple G., Koohmaraie M.*: Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. J. Anim. Sci. 1991, 69, 4449-4460.
53. *Worratao A., Yongsawatdigul J.*: Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (Oreochromis niloticus). Food Chem. 2005, 58, 2041-2045.
54. *Zeece M. G., Katoh K., Robson R. M., Parrish F. C. Jr.*: Effect of cathepsin D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. J. Food Sci. 1986, 51, 797-803.

Adres autora: prof. dr hab. inż. Ilona Kołodziejska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; e-mail: i.kolodziejska@chem.pg.gda.pl

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl