

Dr Mariola KOZŁOWSKA

Dr Agata GÓRSKA

Wydział Technologii Żywności, SGGW w Warszawie

# MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA ULTRADŹWIĘKÓW W PRZETWÓRSTWIE MIĘSA®

## Część II

### WPŁYW ULTRADŹWIĘKÓW NA PROTEOLIZĘ I ULTRASTRUKTURĘ MIĘŚNI, PROCES GOTOWANIA MIĘSA I INAKTYWACJĘ MIKROFLORY

*W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się wykorzystaniu ultradźwięków podczas przetwarzania i obróbki mięsa. Założeniem II części niniejszego artykułu jest wykazanie, w jaki sposób ultradźwięki wpływają na ultrastrukturę i proteolizę mięśni oraz gotowanie mięsa. Opisano również sonifikację jako technologię alternatywną do pasteryzacji i sterylizacji, pozwalającą na znaczne podniesienie czystości mikrobiologicznej przetwarzanego surowca przy niewielkim wpływie na wartość odżywczą i jakość produktu.*

#### WSTĘP

Ultradźwięki są formą mechanicznych wibracji o częstotliwości znajdującej się w przedziale 20 kHz-100 MHz. Zostały one sklasyfikowane na trzy grupy: ultradźwięki o niskim natężeniu, średnim i wysokim natężeniu. Ultradźwięki o niskim natężeniu nie powodują trwałych zmian właściwości fizykochemicznych materiału przez który przenikają. Powszechnie są używane w medycynie, w analizie chemicznej oraz technologii żywności celem monitorowania całości procesu. Ultradźwięki o wysokim natężeniu powodują zmiany fizykochemicznych właściwości wielu produktów w tym mięsa i jego wyrobów.

W części pierwszej artykułu przedstawiono wpływ ultradźwięków na kruchość mięsa, strukturę tkanki łącznej i mięśniowej. Wykazano, że w próbkach poddanych działaniu ultradźwięków dochodzi do zmian organoleptycznych, m.in. poprawy kruchości i soczystości. Założeniem drugiej części artykułu jest przedstawienie, w jaki sposób ultradźwięki wpływają na ultrastrukturę i proteolizę mięśni oraz na zmiany zachodzące w mięsie podczas obróbki termicznej i czystość mikrobiologiczną przetwarzanego surowca.

#### WPŁYW ULTRADŹWIĘKÓW NA PROTEOLIZĘ MIĘŚNI

Liczne badania dowodzą, że istotny wpływ na proces kruśnięcia mięsa wywiera proteoliza miofibryli i innych protein [12]. Spośród trzech grup białek mięśniowych (białka sarkoplazmatyczne, białka miofibryli oraz białka tkanki łącznej) największe znaczenie w kształtowaniu tekstury mięsa przypisuje się proteolitycznemu rozpadowi białek miofibryli. Proteazami odpowiedzialnymi za ten proces są katepsyny oraz obecne w sarkoplazmie i aktywowane przez jony  $Ca^{2+}$  kalpainy [14].

W badaniach wykazano, że ultradźwięki mają zdolność do przerywania błon i uwalniania enzymów ze ściany komórkowej i subkomórkowych przestrzeni [1, 29, 11]. Przyczyną

tych zjawisk jest kawitacja spowodowana wibracjami pęcherzyków. Ten rodzaj wibracji powoduje rozciąganie i skręcanie, a następnie pęknięcie błony komórkowej. Ultradźwiękowe osłabianie błon komórkowych może również powodować wzrost dostępności wapnia dla systemu kalpain, co znacznie przyspiesza proces proteolizy białek miofibryli [13]. Ronackles i wsp. (1992) poddali działaniu ultradźwięków (57 i 62 W przez 10–180 sekund) jagnięce mięśnie szkieletowe i wykazali wzrost proteolitycznej aktywności, objawiający się obecnością peptydów o masie molowej 30 kDa [31]. Got (1999) badał wpływ ultradźwięków (2,6 MHz; 10 W/cm<sup>2</sup>) na proces dojrzewania mięsa oraz jego kruchość. Zauważył 30% natychmiastowy wzrost ilości uwalnianego wapnia w cytoplazmie, związany prawdopodobnie z osłabieniem struktur błon komórkowych. Nie wykazał jednak zdecydowanego wpływu sonifikacji na proces dojrzewania mięsa oraz na proteolizę mięśni. Przyczyną tej sytuacji jest brak kawitacji przy częstotliwościach powyżej 2,5 MHz [9].

Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że stosując ultradźwięki o odpowiednio dobranych parametrach można znacznie skrócić proces dojrzewania mięsa oraz uzyskać żądaną teksturę produktu poprzez przyspieszenie proteolizy mięśni oraz mechaniczne osłabienie ich struktury.

#### WPŁYW ULTRADŹWIĘKÓW NA ULTRASTRUKTURĘ MIĘŚNI

W zależności od zastosowanych parametrów akustycznych ultradźwięki mogą oddziaływać na ultrastrukturę mięśni poprzez kawitację, efekt termiczny i oba efekty jednocześnie. Powodują one destrukcję ultrastruktury mięśni poprzez naruszenie ich komórkowej integralności i sprzyjają ekstrakcji składników komórek. Podczas sonifikacji zawiesiny miofibryli obserwowano niszczenie miofibryli z formowaniem segmentów. Dochodziło do migracji białek, składników mineralnych i innych wewnątrzkomórkowych składników [34]. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Gota (1999) z użyciem ultradźwięków, którym poddano mięśnie

Semimembranosus zaobserwowano wzrost długości sarkomerów poprzez ich rozciągnięcie i zmiany w strefie linii Z [9]. Pomimo to, ze względu na zbyt wysoką częstotliwość (2,6 MHz) użytego w badaniu promieniowania, nie zauważono znaczących modyfikacji w ultrastrukturze mięśni, a w efekcie nie stwierdzono zmian ich tekstury.

W analizowanych próbkach nie doszło do procesu kawitacji. Histologiczna ocena poddanych działaniu ultradźwięków (40 kHz, 2,400 W) mięśni Pectoralis kurcząt wykazała brak zmian w strukturach białkowych sarkomeru [7]. 2 h po stężeniu pośmiertnym zaobserwowano jednak nieznaczne kurczenie się włókien mięśniowych.

## WPŁYW ULTRADŹWIĘKÓW NA PROCES GOTOWANIA MIĘSA

Mięso i jego produkty przed konsumpcją są często poddawane procesowi gotowania, który wywiera ogromny, bezpośredni wpływ na ich teksturę. Zmiany w kruchości i twardości mięsa, które zachodzą podczas tradycyjnego gotowania związane są z wywołanymi ciepłem zmianami dwóch frakcji protein: kolagenu i białek miofibrylarnych [3, 20]. Sposób, w jaki obydwa te komponenty reagują na ogrzewanie jest różny. Białka miofibrylarne zaczynają denaturować przy 40-50°C, co związane jest ze stratą wody [10], w temperaturze powyżej 70°C i wyższej następuje proces twardnienia miofibryli, co przyczynia się do obniżenia kruchości mięsa [27]. Z kolei nierozpuszczalne frakcje kolagenu zaczynają denaturować przy 55°C, a przy 80-100°C proces denaturacji przebiega gwałtownie i łańcuchy kolagenu zaczynają się kurczyć [2, 17]. Można zatem stwierdzić, że zachodząca w podwyższonej temperaturze denaturacja obydwu frakcji białek utrudnia otrzymanie mięsa o zadawalającej teksturze [5]. Istnieją jednak metody wspomagające gotowanie tradycyjne, co umożliwia otrzymanie produktu o pożądanych cechach organoleptycznych. Wykazano, że łączne stosowanie ultradźwięków wraz z konwencjonalnym gotowaniem prowadzi do znacznego wzrostu soczystości i kruchości próbki, a zatem do poprawy jej tekstury. Pohlman i wsp. (1997) przeprowadzili eksperyment, w którym proces gotowania mięsa wspomagali ultradźwiękami (20 kHz, 1000 W) [26]. Stwierdzili wzrost masy próbki sonifikowanej wraz z zachowaną wysoką jej soczystością oraz znaczną redukcją strat wynikających z procesu gotowania. Było to zgodne z odkryciami Reynolds a i wsp. (1978), którzy wykazali, że mięso poddane sonifikacji charakteryzuje się znacznie wyższą soczystością [30]. Dodatkowymi zaletami zastosowania ultradźwięków do obróbki termicznej mięsa jest znaczna oszczędność czasu (zauważono skrócenie czasu gotowania o połowę w porównaniu z metodą tradycyjną) [26], oszczędność energii (3-krotnie mniejsze zużycie energii dla próbek poddanych sonifikacji) [25] oraz większa wydajność procesu gotowania.

## ZASTOSOWANIE ULTRADŹWIĘKÓW W PROCESIE EKSTRAKCJI

Ultradźwięki o dużym natężeniu ułatwiają uwalnianie poszczególnych składników komórki poprzez uszkodzenie jej błony komórkowej. Umożliwiają one szybką, całkowitą i wydajną ekstrakcję enzymów i białek z komórki. Przykładem może być trwający 10 sekund rozpad mitochondrii wątroby szczura w celu analizy ich składu chemicznego [1],

ekstrakcja insuliny z tkanek trzustki [33], czy też reniny przebiegające za znacznie wyższą wydajnością niż przy użyciu metody konwencjonalnej. Tłumaczy się to możliwością wystąpienia wewnątrz tkanek kawitacji, która prowadzi do destrukcji komórki, rozproszenia tkanek i przyspieszenia procesów dyfuzji osmotycznej. Alligar (1975) donosił o zdolności ultradźwięków do wywoływania niepożądanego denaturacji i inaktywacji enzymów [1]. Dlatego w procesach ekstrakcji z użyciem ultradźwięków bardzo ostrożnie dobiera się parametry takie jak: częstotliwość, intensywność oraz czas trwania. Ultradźwięki wspomagają również ekstrakcję białek miofibrylarnych podczas procesu masowania nastrzykniętego solanką mięsa [23]. Podczas tego procesu dochodzi do przyspieszonego rozpadu miofibryli, uwolnienia białek do solanki, a w konsekwencji uformowania gotowego produktu. Produkt z mięśni Semimembranosus z nóg koni po nastrzyku solanką poddanych 10-minutowemu działaniu ultradźwięków cechował się znacznie lepszą wydajnością, kruchością oraz soczystością w porównaniu z uzyskanym tradycyjną metodą masowania próżniowego [8]. Taka zmiana w teksturze mięsa może być spowodowana destrukcją miofibrylarnych frakcji białkowych i innych elementów strukturalnych w wyniku przyspieszenia proteolizy przez enzymy proteolityczne oraz kawitacji wewnątrz mięśni. Proces ekstrakcji z udziałem ultradźwięków stwarza możliwość znacznego ograniczenia ilości używanej do tego procesu soli, co stanowi – biorąc pod uwagę zdrowie konsumenta – istotną zaletę.

## WPŁYW ULTRADŹWIĘKÓW NA INAKTYWACJĘ MIKROFLORY

Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała, że ultradźwięki, oprócz możliwości poprawy tekstury mięsa, wywierają istotny wpływ na czystość mikrobiologiczną przetwarzanego surowca [6]. Poziom inaktywacji mikroflory uzależniony jest głównie od rodzaju szczepu bakterii oraz od takich czynników jak parametry ultradźwięków i czas ich oddziaływania. Na podstawie badań powierzchni surowca poddanego działaniu ultradźwięków można stwierdzić, że prawdopodobną przyczyną obniżenia liczby drobnoustrojów na powierzchni mięsa jest mechaniczna destrukcja komórek mikroorganizmów. W wyniku kawitacji uszkodzeniu mogą ulegać elementy komórek biologicznych, szczególnie błony komórkowe drobnoustrojów oraz struktury tkankowe.

Badania Wrigleya i wsp. (1992) potwierdziły zdolność ultradźwięków o dużym natężeniu do inaktywacji bakterii *Salmonella typhimurium* znajdujących się w pożywkach bułionowych [32]. Podobny efekt zauważono w przypadku traktowania peptonowej zawiesiny izolowanych ze skóry brojlerów szczepów *Salmonella* ultradźwiękami o częstotliwości 20 kHz przez 30 minut [15]. Obserwowano również inaktywację szczepów *Saccharomyces cerevisiae* znajdujących się w zawieszynie wodnej. Było to spowodowane uszkodzeniem przez ultradźwięki błon komórkowych oraz cytoplazmatycznych mikroorganizmów [4]. Wykazano natomiast brak istotnego wpływu ultradźwięków na czystość mikrobiologiczną roladek z kurcząt przechowywanych przez 14 dni. Wprawdzie po 7 dniach obserwowano znaczny efekt bakteriobójczy dla mięsa poddanego sonifikacji w porównaniu z próbką kontrolną, ale różnice te ulegały zanikowi po kolejnych 7 dniach przechowywania. Brak wpływu ultradźwięków na niszczenie bakterii może w tym przypadku wynikać z nieregularnej struktury

skóry brojlerów, sprzyjającej trwałemu przyleganiu mikroorganizmów do jej powierzchni, co chroni je przed zniszczeniem poprzez kawitację [16]. Również Pohlman (1997) zauważył bakteriobójczy efekt ultradźwięków na mikroflorę bakteriijną mięsa. Niestety wraz ze wzrostem czasu przechowywania produktu efekt ten zanikał i był porównywalny z próbką kontrolną [25]. Niezbędne jest zatem prowadzenie dalszych badań określających zależność pomiędzy parametrami sonifikacji, tj. intensywność, częstotliwość, czas ekspozycji a aktywnością mikroorganizmów.

Warto podkreślić, że szczególnie dobre efekty niszczenia drobnoustrojów uzyskano przy połączeniu sonifikacji z odpowiednio dobranym ciśnieniem (manosonifikacja), temperaturą (termosonifikacja) lub obydwoma parametrami (manotermosonifikacja) [18, 19, 28, 21, 24]. W przypadku zastosowania ultradźwięków w celu zniszczenia bakterii *Listeria monocytogenes* – obecnych w mięsie, produktach mięsnych i środowisku przetwórstwa mięsnego – nie uzyskano zadawalającego wyniku (czas potrzebny do zredukowania aktywności bakterii o 90% wyniósł 4,3 minuty). Podwyższenie ciśnienia procesu sonifikacji do 200 kPa (manosonifikacja) spowodowało skrócenie procesu do 1,5 minuty; dalszy wzrost ciśnienia do 400 kPa obniżył czas dezaktywacji bakterii do 1 minuty. W przypadku zastosowania ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz w połączeniu z odpowiednio dobranym ciśnieniem (200 kPa) i temperaturą (64°C) (manotermosonifikacja) odnotowano najszybszą dezaktywację mikroorganizmów (0,34 minuty) [22].

Dodatkową zaletą zastosowania ultradźwięków do inaktywacji drobnoustrojów jest znaczne obniżenie temperatury i czasu sterylizacji, co w istotny sposób może wpływać na jakość produktu końcowego, jak również na ilość zużytej energii.

## PODSUMOWANIE

Stosowanie ultradźwięków w przemyśle mięsnym może być alternatywną technologią do modyfikowania właściwości fizykochemicznych mięsa i jego przetworów. Obróbka mięsa z udziałem ultradźwięków stwarza także możliwość znacznego ograniczenia ilości używanej do tego procesu soli, co stanowi – biorąc pod uwagę zdrowie konsumenta – istotną zaletę. Zauważono, że ultradźwiękowa obróbka termiczna mięsa pozwala na oszczędność czasu, energii oraz na poprawę wydajności. W połączeniu z innymi metodami może ograniczać zanieczyszczenie mikrobiologiczne materiału, co znacznie poprawia bezpieczeństwo żywności.

Prezentowane zagadnienie przed zastosowaniem w praktyce wielkoprzemysłowej, wymaga dalszych badań w skali półtechnicznej.

## LITERATURA

- [1] Alligar H.: Ultrasonic disruption, *Am. Lab.*, 1975, 10, 75-85.
- [2] Bailey A.J., Light N.D.: *Connective Tissue in Meat and Meat Products*, Elsevier Applied Science, London, 1989, 148-168.
- [3] Califano A.N., Berlota N.C., Bevilacqua A.E., Zaritzky N.E.: Effect of processing conditions on the hardness of cooked beef, *J. Food Eng.*, 1997, 24 (1), 41-54.
- [4] Ciccolini L., Taillandier P., Wilhelm A.M., Delmas H., Strehaiano P.: Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and ultrasonic power, *Chem. Eng. J.*, 1997, 65, 145-149.
- [5] Cross H.R., Stanfield M.S., Elder R.S., Smith G.C.: A comparison of roasting versus broiling on the sensory characteristics of beef *Longissimus* steaks, *J. Food Sci.*, 1979, 44, 310-318.
- [6] Davies R.: Observations on the use of ultrasound waves for the disruption of micro-organisms, *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 33, 481-493.
- [7] Dickens, J.A., Lyon, C.E., Wilson R.L.: Effect of ultrasonic radiation on some physical characteristics of broiler breast muscle and cooked meat, *Poult. Sci.*, 1991, 70, 389-396.
- [8] Dolatowski, Z.J.: Influence of ultrasonics on the production technology and quality of cooked ham, *Fleischwirtschaft*, 1989, 69, 106-110.
- [9] Got F., Culioli J., Berge P., Vignon X., Astruc T., Quideau J.M., Lethiecq M.: Effects of high-intensity high-frequency ultrasound on aging rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef, *Meat Sci.*, 1999, 51, 35-42.
- [10] Greaser M.L., Pearson A.M.: *Flesh food and their analogues*, *Food Texture: Measurement and Perception*, Rosenthal J., Ed., Aspen Publishers, Maryland, 1999, 228-255.
- [11] Kim S.M., Zayas J.F.: Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound, *J. Food Sci.*, 1989, 54, 700-703.
- [12] Koohmaraie M.: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat, *Meat Sci.*, 1996, 43 (S), S193-S201.
- [13] Koohmaraie M.: The role of Endogenous Proteases in Meat Tenderness., *Proc. 41st Recip. Meat Conf.*, University of Wyoming, Laramie, 1988, 89-100.
- [14] Kubo T., Gerelt B., Han G.D., Sugiyama T., Nishiumi T., Suzuki A.: Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced or high-pressure treatment, *Meat Sci.*, 2002, 61, 415-418.
- [15] Lillard H.S.: Bactericidal effect of chlorine on attached *Salmonellae* with and without sonification., *J. Food Protect.*, 1993, 56, 716-717.
- [16] Lillard H.S.: Effects of attached bacteria on microbiological sampling techniques, *Poult. Sci.*, 1987, 66 (1), 25-27.
- [17] Locker R.H.: *Muscle in to meat*, *Meat Production and Processing*, New Zeland Society of animal production (Inc), New Zeland, 1989, 173-178.
- [18] Manas P., Pagan R., Raso J., Sala F.J., Condon S.: Inactivation of *Salmonella Typhimurium*, and *Salmonella Senftenberg* by ultrasonic waves under pressure, *J. Food Protect.*, 2000, 63, 451-456.
- [19] Miles C.A., Morley M.J., Hudson W.R., Mackey B.M.: Principles of separating microorganisms from suspensions using ultrasound, *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, 78, 47-54.
- [20] Obuz E., Dikeman M.E., Loughin T.M.: Effects of cooking method, reheating, holding time, and holding



- temperature on beef longissimus lumborum and biceps femoris tenderness, *Meat Sci.*, 2003, 65, 841-851.
- [21] Ordonez J.A., Sanz B., Hernandez P.E., Lopez-Lorenzo P.: A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatment on the survival of thermotolerant streptococci, *J. Appl. Bacteriol.*, 1984, 54, 175-177.
- [22] Pagan R., Manas P., Alvarez I., Condon S.: Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures, *Food Microbiol.*, 1999, 16, 139-148.
- [23] Pearson, A.M.; Dutson, T.R.: In *Advances in Meat Research Restructured Meat and Poultry Products*, Pearson, A.M., Dutson, T.R., Eds.; Van Nostrand Reinhold Company Inc.: New York, 1987, Vol. 3, 1-497.
- [24] Piyasena P., Mohareb E., McKellar R.C.: Inactivation of microbes using ultrasound: a review, *J. Food Microbiol.*, 2003, 87, 207-216.
- [25] Pohlman F.W., Dikeman M.E., Kropf D.H.: Effects of high intensity ultrasound treatment, storage time and cooking method on shear, sensory, instrumental colour and cooking properties of packaged and unpackaged beef Pectoralis muscle, *Meat Sci.*, 1997, 46 (1), 89-100.
- [26] Pohlman F.W., Dikeman M.E., Zayas J.F., Unruh J.A.: Effects of ultrasound and convention cooking to different end point temperatures on cooking characteristics, shear force and sensory properties, composition, and microscopic morphology of beef Longissimus and Pectoralis Muscles, *J. Anim. Sci.*, 1997, 75, 386-401.
- [27] Powell T.H., Dikeman M.E., Hunt M.C.: Tenderness and collagen composition of beef Semitendinosus roasts cooked by conventional convective cooking and modeled, multistage, connective cooking, *Meat Sci.*, 2000, 55 (4), 412-425.
- [28] Raso J., Palo A., Pagan R., Condon S.: Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment, *J. Appl. Microbiol.*, 1998, 85, 849-854.
- [29] Repacholi M.H.: Ultrasound standards and their scientific basis, In *Ultrasound: Medical Applications, Biological Effects and Hazard Potential*, Plenum Press, New York, 1987, 117-128.
- [30] Reynolds J.B., Anderson D.B., Schmidt G.R., Theno D.M., Siegel D.G.: Effects of ultrasonic treatment on binding strength in cured ham rolls, *J. Food Sci.*, 1978, 43, 866-869.
- [31] Ronacles P., Cena P., Beltran J.A.: Ultrasonification of Lamb Skeletal Muscle, Fibres Enhances Post-mortem Proteolysis, 38th ICoMST Clermontferrand, France, 1992, 411-414.
- [32] Wrigley D.M., Llorca N.G.: Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment, *J. Food Protect.*, 1992, 55 (9), 678-680.
- [33] Zayas, J.F.: Effects of ultrasound treatment on the extraction of insulin, *Biotech. And Bioeng.*, 1985, XXVII, 1223-1228.
- [34] Zayas, J.F., Smolski, N.D.: Changes in ultrastructure of muscular tissue resulting from ultrasonic tenderization, XVI Euro, Congr. Meat Res. Workers, Sofia, Bulgaria 1970, 2, 1141.

## THE POSSIBILITIES OF USE THE ULTRASOUNDS IN MEAT PROCESSING

### Part II

## THE INFLUENCE OF THE ULTRASOUNDS ON PROTEOLYSIS AND MUSCLE ULTRASTRUCTURE, THE PROCESS OF MEAT COOKING AND INACTIVATION OF MICROBES

### SUMMARY

*In recent years, much attention is devoted to the utilization of the ultrasound during processing of meat. The object of the II part of this article was to show, how ultrasound radiation influences on the muscle ultrastructure, the proteolysis and on the cooking of meat. It was also described, that sonication as an alternative technology for pasteurization and sterilization, is gaining importance as a method that has significant influence on microbial cleanliness of meat with reduced influence on nutritional values and product quality.*