

WPLYW WYSOKICH CIŚNIEŃ NA MIĘSO

Wprowadzenie

Zainteresowanie stosowaniem wysokich ciśnień rzędu 100-1000 MPa w biologii i przetwórstwie żywnościowym wzrasta z uwagi na fakt uzyskania tą drogą redukcji ilości mikroorganizmów i pasożytów w niskich i umiarkowanych temperaturach oraz możliwości modyfikowania żywności.

W praktyce na małą skalę, za pomocą działania wysokich ciśnień pasteryzuje się:

- głównie żywność pochodzenia morskiego – w Japonii;
- sok pomarańczowy – we Francji;
- pastę z avocado – w USA.

W handlu znajdują się naczynia ciśnieniowe o objętości 50–500 dm³.

Żywność w giętkich wodoszczelnych opakowaniach najczęściej poddaje się działaniu wysokich ciśnień w cylindrach stalowych stosując wodę jako medium przekazujące ciśnienie, które to ciśnienie generuje się za pomocą pomp.

Ciśnienie wywiera duży wpływ na: konformację makrocząsteczek, temperaturę przemian wody i lipidów oraz liczne reakcje chemiczne, a szczególnie na te, które przebiegają ze zmianą objętości (zasada Le Chatelier).

Ciśnienie w żywności (za wyjątkiem tej, w której znajdują się duże przestrzenie gazowe) rozchodzi się w quasi-natychmiastowy i jednolity sposób. Dlatego czas wymagany na przeprowadzenie operacji ciśnieniowej (paskalizacji) nie zależy od rozmiaru próby.

Wpływ wysokich ciśnień na mikroorganizmy

Stopień inaktywacji drobnoustrojów zależy od takich czynników jak:

- rodzaj mikroorganizmu,
- wysokość ciśnienia,
- temperatura i czas procesu,
- pH i składniki żywności lub środowiska dyspersyjnego.

Ogólnie można powiedzieć że:

- Gram ujemne bakterie są bardziej wrażliwe na działanie wysokich ciśnień niż Gram dodatnie,
- formy przetrwalnikowe są bardziej odporne na działanie ciśnienia niż wegetatywne,
- dobre efekty inaktywacji form wegetatywnych uzyskuje się w temp. 50–70°C i prawdopodobnie 0°C, a przetrwalników w temp. 80–100°C,
- mikroorganizmy ulegają trudniej inaktywacji w żywności niż w roztworach,
- oporność mikroorganizmów na działanie ciśnień wzrasta wraz z obniżeniem się aktywności wody w środowisku w którym się znajdują.

Poddając zaszczepiony mikroorganizmami homogenat mięsa wieprzowego o pH 6–7 w temperaturze 25°C przez 10 min. działaniu ciśnienia 400 MPa stwierdzono: redukcję o 6 cykli logarytmicznych takich drobnoustrojów jak: *E.coli*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis*. Natomiast *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus faecalis* ulegają redukcji w podobnym stopniu dopiero przy zastosowaniu ciśnień rzędu 500–600 MPa.

W podanych warunkach nie stwierdzono inaktywacji przetrwalników *Bacillus cereus*.

Carlez i wsp. poddając działaniu ciśnienia przez 20 min. w temp. 20°C rozdrobnione mięso wołowe zaszczepione bakteriami stwierdzili że, aby uzyskać redukcję bakterii o co najmniej 5 cykli logarytmicznych należy stosować ciśnienia powyżej:

- 200 MPa – *Pseudomonas fluorescens*,
- 280 MPa – *Citrobacter freundii*,
- 400 MPa – *Listeria innocua*.

Ponadto wykazano, że endogenna mikroflora rozdrobnionego mięsa jest bardziej odporna na działanie wysokich ciśnień niż ta, którą użyto do inokulacji.

Ważnym spostrzeżeniem wyżej wspomnianych autorów było stwierdzenie, że pewien procent komórek szczepów *Pseudomonas* ulegał stresowi pod wpływem wysokich ciśnień. Mianowicie zanotowano, że pewien procent bakterii zachowujących się jak nieżywe, po przejściu tzw. „fazy naprawczej” (repair phase) – po 3–9 dniowym przechowywaniu mięsa w temperaturze +3°C – były zdolne do rozmnażania. Zjawisko to ma zarówno dodatni (możliwość wydłużenia czasu przechowywania chłodniczego) jak i ujemny aspekt (możliwość przecenienia efektu pasteryzacji).

W rozdrobnionym mięsie kurcząt poddanym działaniu ciśnień $P = 408; 616$ i 888 MPa nastąpiła redukcja mikrobiologicznego obciążenia odpowiednio o 1,7; 3,4; 3,7 cykli logarytmicznych.

Oporne na ciśnienie okazały się beztlenowe bakterie *Carnobacterium divergens* i *Serratia liquefaciens*.

Dobre efekty uzyskano stosując ciśnienie 400 MPa do pasteryzacji stłuszczonych wątrób ($T = 50^{\circ}\text{C}$, $t = 10$ lub 30 min.). W tych warunkach stopień redukcji mikroorganizmów był podobny do uzyskanego przy pasteryzacji termicznej (85°C) przy czym nie następowało wydzielanie się lipidów. Natomiast w wypadku pasteryzacji termicznej wydzielilo się około 15% lipidów.

Kombinacja wysoko-ciśnieniowej i umiarkowanej-temperaturowej pasteryzacji z powodzeniem może być stosowana w wypadku wielu mięsnych produktów i gotowej żywności bazującej na surowcach mięsnych.

Sz szczególnie przydatna może być ta metoda w wypadku produktów znajdujących się w szczelnych opakowaniach, a które mogły ulec skażeniu podczas porcjowania, plasterkowania lub rozdrabniania.

Stosując wysokie ciśnienia uzyskuje się inaktywację parazytów np. w wypadku *Trichinella spiralis*, dobre wyniki uzyskano w następujących warunkach: $P = 175$ MPa, $T = 25^{\circ}\text{C}$, $t = 10$ min.

W przypadku mięsa i jego przetworów dobre efekty pasteryzacyjne uzyskuje się stosując następujące parametry procesu: $P = 400\text{--}600$ MPa; $T = 0\text{--}70^{\circ}\text{C}$; $t = 1\text{--}10$ min. Ciśnieniowa sterylizacja jest możliwa w zakresie temperatur $80\text{--}100^{\circ}\text{C}$. Stosowanie wysokich ciśnień w niskich i umiarkowanych temperaturach powoduje inaktywację mikroorganizmów bez pogorszenia smaku, zapachu i często barwy. Natomiast wpływ na teksturę jest znaczący przy czym w niektórych wypadkach dodatni a w innych ujemny. Mechanizm tych oddziaływań nie jest wyjaśniony.

Wpływ wysokich ciśnień na składniki mięsa

Woda. Woda pod wpływem wysokich ciśnień ulega odwracalnej kompresji, której stopień zależy od wysokości ciśnienia (np. w 100 MPa objętość wody zmniejsza się o 4%, a w 400 MPa o 15%). Żywność zawierająca dużą ilość wody oraz mało przestrzeni wypełnionych gazami zmienia swoją objętość w podobnym stopniu jak woda.

Adiabatycznej kompresji towarzyszy wzrost temperatury wody o $2\text{--}3^{\circ}\text{C}$ na 100 MPa. Wartości energii kompresji są stosunkowo niskie i tak energia kompresji 1dm^3 wody pod ciśnieniem 400 MPa wynosi 19 kJ. Tym niskim poziomem energetycznym można tłumaczyć brak bezpośredniego oddziaływania wysokich ciśnień na kowalencyjne wiązania składników żywności. W warunkach wysokich ciśnień woda ulega dysocjacji, skutkiem czego obniża się pH o $0,2\text{--}0,5$ jednostek /100 MPa.

Innym zjawiskiem spowodowanym działaniem wysokich ciśnień jest obniżenie się temperatury krzepnięcia wody wraz ze wzrostem ciśnienia do minimalnej wartości -22°C przy 207,5 MPa. Z diagramu fazowego wynika, że woda pod ciśnieniem 210 MPa jest w stanie płynnym w temperaturze -22°C .

Wykorzystanie tego zjawiska dało pozytywne rezultaty w wypadku:

1. Rozmrażania ryb w temperaturach niższych od -10°C przy ciśnieniu 200 MPa. W tych warunkach osiągnięto wzrost prędkości rozmrażania, zmniejszenie strat rozmrażalniczych oraz poprawę jakości mięsa.
2. Przechowywania ryb przez 50 dni w temperaturze 8°C pod ciśnieniem 100 MPa lub w temperaturze 15°C pod ciśnieniem 170 MPa – nie stwierdzono zepsucia prób, a denaturacja zamrażalnicza białek oraz straty przechowalnicze były minimalne.

Lipidy. Temperatura topnienia triacylogliceroli rośnie odwracalnie wraz ze wzrostem ciśnienia około $10^{\circ}\text{C}/100\text{MPa}$. Lipidy znajdujące się w stanie ciekłym w temperaturze pokojowej pod wpływem wysokich ciśnień krystalizują tworząc gęste i stabilne kryształy. Prędkość oksydacji lipidów mięśniowych wzrasta wraz ze wzrostem ciśnienia i czasu jego działania, w wypadku, gdy ciśnienie wywiera się na mięśnie lub ekstrakty lipidów w obecności tkanki mięśniowej. Natomiast nie stwierdzono wpływu wysokich ciśnień na oksydację ekstraktów lipidowych.

Rezultaty badań przeprowadzonych na rozdrobnionym mięsie wieprzowym i miofibrylach sugerują że:

- ciśnienie do 300 MPa nie wpływa na prędkość oksydacji lipidów w rozdrobnionym mięsie,
- zarówno w wypadku miofibryli jak i rozdrobnionego mięsa ciśnienie 800 MPa działające przez 20 min. w temperaturze 20°C przyspiesza prędkość oksydacji lipidów podczas przechowywania prób w temperaturze 4°C ,
- nierozpuszczalne w wodzie białka katalizują proces oksydacji lipidów.

Białka. Badania wpływu wysokich ciśnień na białka mięśniowe wykazały, że ciśnienia rzędu 300–400 MPa powodują denaturację zarówno białek sarkoplazmatycznych jak i miofibrylarnych oraz konwersję mioglobiny/oksymioglobiny do metmioglobiny. Wyżej wspomniane reakcje najprawdopodobniej odgrywają rolę w katalitycznej oksydacji lipidów.

Zmiany konformacyjne białek zachodzące pod wpływem działania wysokich ciśnień często przypisywane są zmianom objętości (około 1%). Wówczas zmieniają się odległości między atomami tworzącymi słabe między- i wewnątrz molekularne wiązania. Pomimo tego, że mechanizm tych oddziaływań nie jest jeszcze wyjaśniony to można uznać, że wysokie ciśnienia:

- indukują rozkład wiązań solnych i hydrofobowych oraz redukują ilość cząsteczek wody przylegających do hydrofobowych grup,
- wzmacniają wiązania wodorowe,
- nieznacznie wpływają na wiązania kowalencyjne i pierwszorzędą strukturę białek.

Liczne badania wykazały, że działanie ciśnień rzędu 100–200 MPa w temperaturze pokojowej powoduje:

- dysocjację oligomerycznej struktury białek w kierunku monomerów,

- częściowe rozfałdowanie i denaturację monomerów,
- agregację białek,
- żelowanie przy dostatecznej koncentracji białek i wysokości ciśnienia,
- wzrost ilości międzycząsteczkowych wiązań -S-S.

Całkowita ekstraktywność mioglobiny zmniejsza się pod ciśnieniem 200-500 MPa, a ilość metmiooglobiny wzrasta kosztem oksymiooglobiny w zakresie ciśnień 400-500 MPa, powodując zmianę barwy mięsa na szaro-brunatną. Tworzeniu się metmiooglobiny a tym samym zmianie barwy można zapobiec przez: całkowite usunięcie tlenu ze środowiska np. przez zastosowanie opakowania próżniowego z pochłaniaczem tlenu lub przez przeprowadzenie mioglobiny i oksymioglobiny w nitrozową pochodną.

W 0,6 M roztworze KCl o pH 6,5 miozyna i aktomiozyna pod wpływem ciśnienia 150 MPa działającego przez 1 godz. w temperaturze 0°C ulegają następującym zmianom: miozyna tworzy zachodzące na siebie dimery, natomiast aktomiozyna rozpada się na mniejsze fragmenty, które nie są produktami dysocjacji aktomiozyn. Miozyna, aktyna i aktomiozyna ulega również zmianom konformacyjnym. Aktywność ATP-azowa aktomiozyny aktywowanej jonami Ca^{+2} i Mg^{+2} w 0,6 M roztworze KCl, o pH 6,5 obniża się wraz ze wzrostem ciśnień do 75 MPa (1 godz. 0°C). Uważa się, że prawdopodobnie następuje zniszczenie integralności aktomiozynowego kompleksu na skutek modyfikacji troponiny. Ikeuchi i wsp. badając wpływ wysokich ciśnień na aktywność miozyny i aktomiozyny w 0,6 M roztworach KCl o pH 6,0 stwierdzili, że aktywność ATP-azy aktywowanej Mg^{+2} łatwo obniża się wraz ze wzrostem ciśnienia do 200 MPa, podczas gdy aktywowanej Ca^{+2} obniża się dopiero pod działaniem ciśnienia wyższego od 200 MPa. Na tej podstawie wnioskuje, że denaturacja aktyny zachodzi pod ciśnieniem co najmniej 100 MPa, a miozyny wyższym niż 200 MPa. F-aktyna ulega konwersji do G-aktyny w roztworze 0,06 M KCl, o pH 8,1 w nieobecności ATP w zakresie ciśnień 147–294 MPa. Obecność ATP wywiera efekt ochronny.

Konsekwencją zmian zachodzących pod wpływem wysokich ciśnień w białkach miofibrylarnych jest zmiana ich właściwości. Macfarlane i McKenzie, stwierdzili wzrost rozpuszczalności białek miofibrylarnych pod wpływem ciśnienia 150 MPa, zależny od pH, temperatury, rodzaju i stężenia soli. Rozpuszczalność białek miofibrylarnych zwiększa się w roztworach o niskiej sile jonowej na skutek działania wysokich ciśnień. Pod wpływem działania wysokich ciśnień zmieniają się również właściwości żelujące białek miofibrylarnych.

Stwierdzono dodatni wpływ wysokich ciśnień na żelowanie miozyny i aktomiozyny w roztworach o niskiej sile jonowej (0,1–0,4 M NaCl) w temp. 70°C. Natomiast w roztworach o wyższej sile jonowej dodatni wpływ odnotowano jedynie w wypadku aktomiozyny.

Miozyna spontanicznie żeluje w 0,1 M roztworach KCl w temp. pokojowej pod ciśnieniem wyższym od 200 MPa. Czas działania ciśnienia wymagany do żelowania zależy od wysokości ciśnienia i stężenia białka.

Poprawa właściwości żelujących pod wpływem ciśnień ma odbicie:

1. We wzroście siły wiązania mięsa drobnorozdrobnionego z dodatkiem 10% wody i 0; 0,5; 1,0; 3,0% NaCl pod ciśnieniem 150 MPa. Najprawdopodobniej można to wiązać z deagregacją i rozfałdowaniem białek odpowiedzialnych za tę właściwość.
2. We wzroście wydajności i wzmocnieniu struktury kiełbas drobnorozdrobnionych zawierających małe ilości NaCl i fosforanów, a szczególnie tych do których dodano mało tłuszczu lub dużo wody ($P > 200$ MPa, $t = 5$ min., $T = 10^{\circ}\text{C}$).
3. We wzroście parametrów mechanicznych (siła niszcząca, praca penetracji) nieogrzewanego farszu drobnorozdrobnionego.
4. W restrukturyzacji drobnorozdrobnionego mięsa bez wydzielania soku mięsnego, charakteryzującej się powstaniem żelu o gładkim wyglądem, kohezyjnej teksturze i dużej zdolności retencji wody.

Pod wpływem działania wysokich ciśnień zmienia się aktywność wielu enzymów. Wykazano drastyczne obniżenie się aktywności kalpain w wołowych mięśniach supraspinatus i semitendinosus w stanie pre-rigor pod wpływem działania ciśnienia 100 MPa przez 2 minuty w temp. 37°C . Natomiast podczas chłodniczego przechowywania tych mięśni nie obserwowano dalszych zmian aktywności kalpain.

Działając ciśnieniem rzędu 100 do 500 MPa przez 10 minut w temp. 25°C stwierdzono, że w mięśniach wołowych w stanie post-rigor poszczególne katepsyny zachowują się różnie np. kwaśne są odporne; alkaliczne i obojętne ulegają nieznacznej inaktywacji pod ciśnieniem wyższym niż 400 MPa; amino- i karboksypeptydazy łatwo ulegają inaktywacji powyżej 200 MPa.

Horgan podaje, że aktywność ATP-azy sarkoplazmatycznej aktywowanej jonami wapnia obniża się pod wpływem działania wysokich ciśnień na mięso w stanie pre- i post-rigor. Przy czym obniżenie aktywności zachodziło wolniej w czerwonych mięśniach wolnych niż białych szybkich.

Wpływ wysokich ciśnień na mięso w stanie pre-rigor

W mięśniach poddanym działaniu wysokich ciśnień w stanie pre-rigor szybko obniża się pH oraz następuje silna kontrakcja od 35 do 50 % oraz zmienia się struktura. Wielkość tych zmian zależy od czasu działania ciśnienia, temperatury oraz typu mięśnia. Na przykład stosując kilkuminutowe działanie ciśnienia i następnie przechowując mięso (wołowe lub owcze), końcowe pH osiąga się po 2 godzinach, podczas gdy w mięsie nie poddanym działaniu ciśnienia tę wartość osiąga się po 24 godz.

Pomimo tego, że mięso poddane działaniu wysokich ciśnień ulega silnej kontrakcji i jest twarde, to po gotowaniu jest ono bardziej kruche (niższa wartość siły cięcia) oraz zawiera więcej wody niż mięso nie poddane tej operacji w stanie pre-lub post-rigor. Tenderyzację mięsa wywołaną działaniem wysokich ciśnień na mięso w stanie pre-rigor potwierdzili. Efekt tenderyzacyjny zależy od stopnia kontrakcji jakiej uległo mięso podczas procesu ciśnieniowego. Chociaż wartości kontrakcji spowodowanej wysokimi ciśnieniami są podobne do wartości stwierdzonych podczas skurczu chłodniczego, to w pierwszym wypadku odnotowuje się efekt tenderyzacyjny zamiast usztywnienia struktury po obróbce termicznej. Wydaje się, że im wyższa kontrakcja tym niższa siła cięcia mięsa gotowanego. Odnotowano modyfikację struktury sarkomerów polegającą na:

- kontrakcji pasm poszczególnych sarkomerów ze zbliżeniem się sąsiadujących Z-dysków,
- naprężeniu sarkomerów nie ulegających kontrakcji,
- ekstensywnym i regularnym skręceniu sarkolemy tych włókien, które uległy kontrakcji,
- separacji otoczek sarkolemy i endomyzjum,
- wzroście przestrzeni między włóknami i miofibrilami,
- pęcznieniu, a niekiedy pękaniu mitochondriów,
- pęcznieniu sarkoplazmatycznego retikulum,
- degradacji Z-dysku, zaniku linii M oraz pasma H.

Wpływ wysokich ciśnień na mięso w stanie post-rigor

Mięso poddane działaniu wysokich ciśnień w stanie post-rigor nie ulega kontrakcji, natomiast zmianom ulega struktura sarkomerów.

Zaobserwowano nieobecność linii M w centralnym obszarze pasma A oraz zmniejszenie integralności filamentów w paśmie I pod wpływem działania ciśnienia 100 MPa przez 60 min. w temperaturze 25°C na owczy mięsień semimembranosus, oraz małe zmiany Z-dysku, poprzeczne pęknięcia w obszarze linii M i zanik poprzecznych mostków pomiędzy grubymi filamentami.

Pomimo zmian struktury sarkomerów nie odnotowano efektu tenderyzacyjnego na skutek działania ciśnienia poniżej 150 MPa w temperaturze do 30°C.

Stosując kombinację wysokiego ciśnienia 150 MPa przez 1 godz. i podwyższonej temperatury Bouton i wsp. stwierdzili, zmniejszenie twardości mięsa wykazującego skurcz chłodniczy. W wypadku wołowego mięśnia semitendinosus przy wyżej podanych parametrach ciśnienia optymalny zakres temperatury wyniósł od 55–60°C. Należy zaznaczyć, że efektywność tej operacji zależy od pH.

Możliwość zastosowania operacji działania wysokich ciśnień w podwyższonej temperaturze do niwelacji skurczu chłodniczego ogranicza fakt zmiany barwy mięsa wraz ze wzrostem temperatury. Ciśnienia powyżej 150 MPa działające na mięso w stanie post-rigor powodują zmianę jego wyglądu, barwy i mikrostruktury. Stwierdzono fragmentację miofibrili i modyfikację mikrostruktury sarkomeru i konwersję α konektyny do β konektyny z uwolnieniem komponenta o masie cząsteczkowej 100 kDa.

Nie ma jednoznacznych wyników świadczących o efekcie tenderyzacyjnym wywołanym działaniem ciśnienia powyżej 150 MPa.

Wysokie ciśnienia nie powodują istotnych zmian w ultrastrukturze kolagenu.

Podsumowanie

Nie ma wątpliwości, że struktura i białkowe składniki mięśni są bardzo czułe na działanie wysokich ciśnień i że zachodzą zjawiska zarówno szkodliwe jak i korzystne podczas tej operacji. Do szkodliwych zalicza się zmianę barwy świeżego mięsa. Do korzystnych:

- ciśnieniową tenderyzację, szczególnie mięsa wykazującego skurcz chłodniczy,
- ciśnieniową pasteryzację,
- wydłużenie czasu przechowywania chłodniczego,
- ciśnieniowe żelowanie, wiązanie rozdrobnionego mięsa bez dodatku soli oraz poprawę retencji wody,
- niskotemperaturowe rozmrażanie mięsa – redukcja ilości wydzielanego soku mięsnego,
- szybkie i jednolite zamrażanie – tworzenie się mikrokryształów,
- ciśnieniowe polepszenie właściwości funkcjonalnych białek.

Operacja ciśnieniowa w połączeniu z próżniowym pakowaniem, umiarkowanymi temperaturami, chłodniczym przechowywaniem mogą być stosowane do szerokiego asortymentu produktów mięsnych, w tym peklowanego mięsa, gotowanych dań, mechanicznie odzyskanego mięsa. Główną wadą stosowania ciśnieniowej operacji jest konieczność opakowania żywności oraz wysoki koszt naczyń ciśnieniowych.

Opracowała prof. dr hab. Teresa Skrabka-Błotnicka

na podstawie: J. Claude Cheftel i Joseph Culioli pt. "Effect of high pressure on meat: a review" – ogłoszonego na 42 Międzynarodowym Kongresie Nauki i Technologii Mięsa w Lillehammer w 1996r., sekcji nr 6 "Postęp w technologii przetwarzania".

Autorka posiada pełny tekst tego wykładu ze spisem literatury źródłowej. ☒