

JERZY REJT, ANTONI RUTKOWSKI

## Detekcja histologiczna białek sojowych w przetworach mięsnych

Z Instytutu Technologii Żywności SGGW-AR w Warszawie

Światowa tendencja poszukiwań nowych źródeł białka, jak i jego przetworzenia w produkty akceptowane przez konsumenta, znalazła odbicie we wszechstronnych badaniach nad otrzymywaniem różnorodnych produktów białkowych z ziarna sojowego.

Obecnie w przemyśle mięsnym są stosowane takie produkty sojowe, jak: mąka sojowa, kasze (tzw. grys), koncentraty białkowe, które są dodawane w większych ilościach, jak również izolaty białkowe dodawane w stosunkowo niewielkich ilościach celem poprawienia cech jakościowych przetworów. Opracowanie w latach siedemdziesiątych technologii teksturowanych (ekstrudowanych) preparatów białek sojowych zwiększyło możliwość substytucji, szczególnie w przemyśle mięsnym. Aktualnie substytuty białek soi stosuje się w produkcji wędlin, konserw, produktów garmazeryjnych typu mięsa mielonego, hamburgerów, klopsików, pulpetów itp.

Występujący na całym świecie, a również i w naszym kraju trend intensywnej substytucji białek mięsnych białkami roślinnymi uzasadnia potrzebę opracowania metod ich wykrywania i identyfikacji. Warunkuje to odpowiednią kontrolę jakości gotowego produktu oraz zabezpiecza konsumenta przed ewentualnymi zafałszowaniami.

Sposoby wykrywania i oznaczania ilościowego mąki, koncentratów, izolatów lub teksturatów sojowych w produktach mięsnych ukształtowały kilka kierunków badań. Metodycznie są to:

— rozdziały rozpuszczalnych w wodzie lub buforze białek drogą elektroforezy przy zastosowaniu żelu poliakrymidowego, merkaptotanolu, dodecylsulfonianu sodowego,

— stosowanie metod immunologicznych w wykrywaniu białek niemięśniowych w produktach mięsnych poprzez odczyn precipitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym oraz odczynu hemaglutynacji,

— stosowanie immunoelektroforezy — odczynu stanowiącego połączenie elektroforezy i precipitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym,

— histochemiczne metody analizy przetworu mięsnego z dodatkiem białka sojowego, opierające się na wykrywaniu obecności węglowodanów słabo lub nierozpuszczalnych, występujących w ścianie komórki ziarna sojowego (4, 5, 7). Stosowane były również próby mikroskopowej analizy budowy strukturalnej i morfologicznej przetworu mięsnego z dodatkiem białka sojowego, stosując metodę barwienia rutynowego (3).

Wśród innych proponowanych metod opartych na analizie naturalnych składników białek sojowych trzeba wymienić metody oznaczania zawartości magnezu, saponin, stachiozy, jak również metody porównawczej analizy poziomu wybranych aminokwasów czy peptydów.

Przedstawione kierunki badań mające na celu opracowanie rutynowej metody wykrywania obecności białka sojowego w produkcie mięsnym, jak i jego identyfikacji w mniejszym lub większym stopniu spełniają pokładane w nich nadzieje. Spośród nich metodą najbardziej czułą, a jednocześnie pozwalającą ilościowo i jakościowo wykazać obecność białka sojowego jest metoda elektroforetycznego rozdziału białek. Badania histochemiczne umożliwiają natomiast w stosunkowo prosty sposób optyczne wykrycie obecności substytutów roślinnych w produkcie mięsnym, z możliwością obserwacji układu strukturalnego badanego produktu.

Mając na uwadze znaczenie tej metody dla prac o charakterze technologicznym np.: dla charakterystyki rozprowadzenia substytutu czy związania jego z substratem podjęliśmy pracę nad ustaleniem przydatności metody histochemicznej do:

— wykrywania białek soi w farszach mięsnych,

— jakościowej identyfikacji białek sojowych dodanych do modelowych farszów mięsnych w postaci grysu, izolatu oraz teksturatu sojowego.

### Materiał i metody

Surowcem do wykonania farszy modelowych były: m. najdłuższy grzbietu (*m. longissimus dorsi*) wykrawany z rostbeifu, słonina, chlorek sodowy, substytuty sojowe w postaci grysu (Soya bits 25T), izolatu (Promine F) firmy Central Soya oraz teksturatu (TVP) firmy ADM.

Tab. 1. Skład mięsnych farszów modelowych w %

| Składniki farszów       |       |       |         |             |      |
|-------------------------|-------|-------|---------|-------------|------|
| Dodany zamiennik sojowy |       | Mięso | Słonina | Woda dodana | NaCl |
| Rodzaj                  | Ilość |       |         |             |      |
| próba kontrolna         | —     | 40,2  | 23,9    | 33,7        | 1,7  |
| * grys                  | 13,2  | 32,2  | 23,9    | 28,9        | 1,7  |
| * teksturat             | 12,5  | 32,2  | 23,9    | 29,0        | 1,7  |
| ** izolat               | 2,1   | 32,2  | 23,9    | 29,4        | 1,7  |

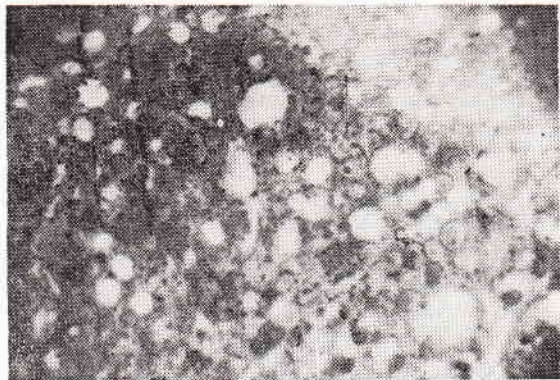
Objaśnienia: \* produkt sojowy uwodniony; \*\* — produkt sojowy suchy.

Recepturę farszu ustalono kierując się zasadą wymiany 20% białka mięśniowego białkiem roślinnym (ryc. 1). W miejsce wycofanej masy mięsnej wprowadzono określone ilości grysu, izolatu i teksturatu (o zawartości wymienianej ilości białka) oraz uzupełniającą ilość wody (6). Grys oraz teksturat sojowy przed wprowadzeniem do farszu uwadniano przez 24 godz. w temp. 5°C. Surowiec mięsny oraz słoninę rozdrabniano na wilku (przez siatkę o średnicy 3 mm) trzykrotnie. Następnie całość mieszano na kutrze laboratoryjnym (firmy Hobart model 82142) 7 minut. W czasie kutowania dodawano sól, zamienniki białka mięsnego oraz wodę (lód). Otrzymane farsze poddano obróbce termicznej w izolowanych warunkach łaźni wodnej (80°C) do osiągnięcia temperatury wewnętrznej farszu 68°C.

Z wykonanych farszy modelowych pobrano wycinki materiału i utrwalono w 10% formalinie w ciągu 24 godzin. Po przepłukaniu utrwalonego materiału wodą bieżącą oraz wodą destylowaną stosowano technikę żelatynową przy zatapianiu (2). Po utwardzeniu otrzymanych bloczków w 8% formalinie (1–2 dni) wykonano skrawki metodą mrożeniową 15–20 u. Po przeprowadzeniu barwienia wybiórczego na węglowodany nierozpuszczalne zamknięto otrzymany preparat w glicerożelu (1).

### Barwienie preparatów

Barwienia przeprowadzono w oparciu o wyniki badań Linke (7), Coomaraswamy (4) i Flint (5) modyfikując metodykę w celu skrócenia czasu wykonywania preparatu. Mając na uwadze rutynowo-diagnostyczny charakter wykonywanych preparatów nie wykonano barwienia pełnego, ograniczając się do wybarwienia tylko substytutu roślinnego.



Ryc. 1. Farsz mięsny — kontrola. Pow. ok. 30×

Zasada metody polega na utlenieniu występujących w tkankach roślinnych węglowodanów słabo rozpuszczalnych w wodzie lub węglowodanów nierozpuszczalnych kwasem nadjodowym z przekształceniem grup 1,2 glikolowych ( $\text{HOCH} - \text{CHOH}$ ) w grupy aldehydowe. Grupy aldehydowe reagując z odczynnikiem Schiffa (leukozwiązkiem powstałym w wyniku odbarwienia fuksyny) dają czerwono-fioletowe zabarwienie. Zaletą kwasu nadjodowego w reakcji PAS (Periodic acid — Schiff) jest zatrzymanie reakcji utleniania na etapie wytwarzania aldehydów i dalsze utlenianie nie prowadzi do powstania grup karboksylowych. Reakcja PAS następuje zarówno z polisacharydami właściwymi, jak też z innymi cukrowcami (pentozy, heksozy, kwasy heksauronowe). Istnieje również możliwość bezpośredniej reakcji ligniny z odczynnikiem Schiffa oraz wolnych aldehydów znajdujących się w badanym środowisku. Koniecznym jest zatem wykonanie prób kontrolnych oraz usunię-

cie, gdy to jest potrzebne, wolnych aldehydów przez przemycie materiału roztworem kwaśnego siarczynu sodowego.

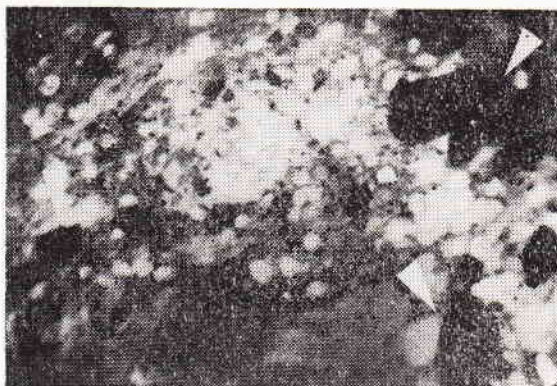
#### Odczynniki:

- odczynnik Schiffa (1),
- 0,5% wodny roztwór kwasu nadjodowego,
- 2% roztwór kwaśnego siarczynu sodowego.

Wykonanie preparatu składa się z następujących kolejnych czynności:

- przeprowadzenie skrawków przez kąpiel w roztworze kwasu nadjodowego, ustalając optymalny czas reakcji utlenienia w oparciu o intensywność barwy substytutu sojowego w obrazie gotowego preparatu. Kąpiel należy przeprowadzić w temp. pokojowej. Ustalony przez nas doświadczalnie czas reakcji 20 minut. Skrawki przeznaczone do kontroli przebiegu reakcji barwi się bez kąpeli w kwasie nadjodowym,
- płukanie skrawków w wodzie bieżącej 15 min. oraz ich przemycie wodą destylowaną,
- wykonanie barwienia odczynnikiem Schiffa (15 min.) przez kąpiel w zamkniętym naczyniu w ciemni,
- przemycie skrawków wodą destylowaną (10 min.),
- płukanie roztworem kwaśnego siarczynu sodowego (3–4 min.),
- płukanie w wodzie bieżącej (15 min.) oraz przemycie wodą destylowaną,
- zamknięcie preparatu w glicero-żelu.

Jeżeli preparat ma być przechowywany przez dłuższy okres czasu, należy zamknąć go w polimerach glikolu etylenowego lub po odwodnieniu w balsamie kanadyjskim.



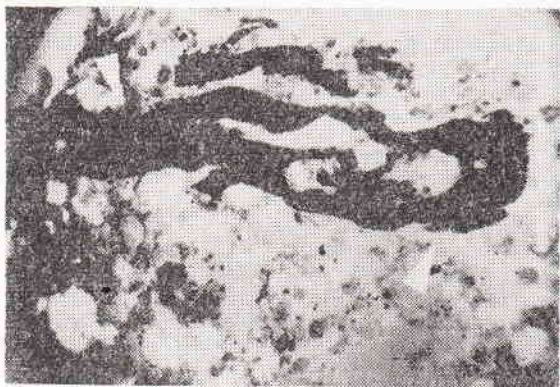
Ryc. 2. Farsz mięsny z dodatkiem grysu sojowego. Pow. ok. 30×

### Omówienie wyników

Obserwacja mikroskopowa preparatów histologicznych sporządzonych z farszu modelowego wskazuje na łatwe rozróżnienie rozdrobnionych elementów włókien mięśniowych, fragmentów tkanki tłuszczowej, kropi tłuszczu, jak i wolnych przestrzeni powietrznych znajdujących się w produkcie. Porównując budowę morfologiczną farszu modelowego i farszów z dodatkiem preparatów sojowych nie stwierdzono w obrazie histologicznym zmian, które wskazywałyby na to, że dodatek substytutu roślinnego zmienia charakter strukturalny badanego układu modelowego (mięso—woda—tłuszcz).

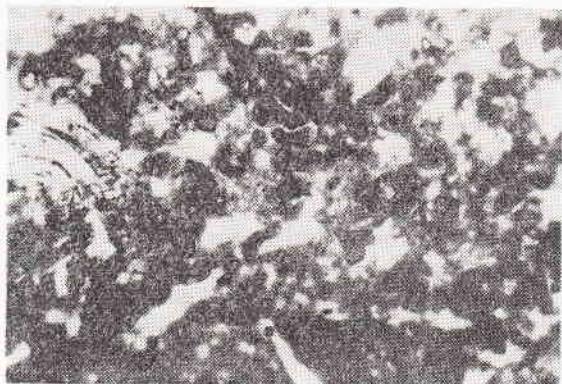
Stwierdzenie to potwierdzają wyniki, które uzyskali we wcześniejszych pracach inni autorzy (4, 5, 7).

Preparaty histologiczne układów modelowych, w które wprowadzono substytuty sojowe, wskazują na możliwość łatwego wykrycia obecności grysu (ryc. 3) oraz teksturatu sojowego (rys. 4) w farszach mięsnych. Obraz histologiczny farszów, do których wprowadzono tego typu substytut sojowy, wskazuje wyraźne wybarwienia koloru czerwono-fioletowego na tle jasno różowej barwy układu mięsno-tłuszczowego. W przedstawionej czarno-białej dokumentacji fotograficznej wtręty sojowe są widoczne w postaci zaciemnień znacznie mniej kontrastowych aniżeli w obrazie barwnym.



Ryc. 3. Farsz mięsny z dodatkiem teksturatu sojowego. Pow. ok. 30 ×

Wielkość, jak i kształt wybarwień, jest różny i umożliwia jakościowe ustalenie charakteru substytutu. Gryś obserwowany w farszu mięsnym występuje w postaci wtrętów różnokształtnych (ryc. 3). W większych jego elementach widoczna jest mikrostruktura przypominająca strukturę wielokomórkową o pojedynczych „komórkach” zbliżonych kształtem do prostokąta. Preparaty histologiczne układów mięsnych z dodatkiem teksturatu sojowego (ryc. 4) wykazują obecność wtrętów teksturatu w większości o kształcie wydłużonym. W swej budowie większe elementy posiadają charakter budowy włóknkowej. Obserwowany gryś, jak i teksturat, mimo stosowanego kutrowania występuje w sposób nieuporządkowany w formie dużych, średnich i małych wtrętów.



Ryc. 4. Farsz mięsny z dodatkiem izolatu sojowego. Pow. ok. 30 ×

Izolat sojowy (ryc. 5) wprowadzony do farszu mięsnego nie wykazuje tak charakterystycznych wybarwień, jakie obserwujemy w obrazie farszu z dodatkiem grysu i teksturatu. Występujące w izolacie niewielkie ilości węglowodanów, jak i wysoki stopień jego rozprószania w farszu dają w efekcie obraz histologiczny z delikatnymi smugami wybarwień. Intensywność tych wybarwień jest słabo kontrastująca z barwą innych składników farszu.

### Wnioski

1. Obecność produktu sojowego dodanego do farszu mięsnego w postaci grysu i teksturatu można wykryć metodą histochemiczną, opartą na wybarwieniu odczynnikami Schiffa.

2. Metoda histochemiczna umożliwia identyfikację rodzaju (dodanego do farszu mięsnego) substytutu sojowego w warunkach porównawczej analizy obrazu histologicznego.

3. Metoda histochemiczna nie jest przydatna do rutynowej identyfikacji izolatów sojowych ze względu na niewielką zawartość w ich składzie rodzimych węglowodanów, które ulegają wybarwieniu różnicującym.

### Piśmiennictwo

1. Broda B.: Materiały histochemii roślinnej. PZWL 1971.
2. Burck H. C.: Technika histologiczna. PZWL 1975.
3. Cassens R. G., Terrel R. N., Couch C.: J. Fd Sci. 55, 1070, 1975.
4. Coomaraswamy M., Flint F. O.: Analyst, Lond. 98, 542, 1973.
5. Flint F. O., Lewin Y. A.: J. Fd Technol. 11, 137, 1976.
6. Kwaśniewska I.: Praca doktorska. SGGW-AR 1976.
7. Linke H.: Fleischwirtschaft 49, 469, 1969.

Adres autora: lek. wet. Jerzy Rejt, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa.

Рейт Е., Рутковский А. — Гистологическая детекция соевых белков в мясопродуктах.

Применяли гистохимический метод для обнаружения и идентификации белковых соевых продуктов в мелкоразмельченных модельных мясных фаршах. В гистохимическом анализе опирались на цветной реакции (PAS) слабо- или совсем нерастворимых углеводов, отмечаемых в стенке клетки соевого зерна. Микроскопическая картина сделала возможной качественную идентификацию соевых отрубей и текстурата на основе их структуры. Гистохимический метод непригоден для обнаружения прибавки соевого изолята к мясному фаршу. В исследованиях не отметили морфологических изменений в системе мясо-вода-жир с прибавкой растительного заменителя.

Rejt J., Rutkowski A. — Histological detection of soya bean proteins in meat products.

Histochemical technique was applied to discover and identify soya bean proteins in meat products crushed into small bits. The method used was based on colour reaction (PAS) of carbohydrates appearing in the wall of soya bean cells. Microscopic picture enabled to make qualitative identification of soya bean additions on the strength of their structure. Histochemical method proved to be useful to discover of soya bean in meat products. There was not found any morphological changes in the system meat-water-fat with the addition of plant substitutes.