

УДК 664.951.037.5.014 : 543

## Биохимические критерии оценки качества белковой составляющей копченой рыбопродукции

Д.И. Пискунович<sup>1,3</sup>, В.А. Мухин<sup>2,3</sup>, К.С. Рысакова<sup>2,3</sup>, И.И. Лыжов<sup>3</sup>,  
Л.Н. Голикова<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Факультет пищевых технологий и биологии МГТУ,  
кафедра технологий пищевых производств

<sup>2</sup> Факультет пищевых технологий и биологии МГТУ,  
кафедра микробиологии и биохимии

<sup>3</sup> Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного  
хозяйства и океанографии (ПИНРО), лаборатория биохимии и технологии

<sup>4</sup> Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного  
хозяйства и океанографии (ПИНРО), лаборатория болезней промысловых  
гидробионтов

**Аннотация.** Проведена оценка качества копченой рыбной продукции при различных режимах хранения. Выявлены наиболее объективные показатели для оценки качества белковой составляющей копченой рыбопродукции – изменение фракционного состава белков в сочетании с определением аминного азота и степени гидролиза белков. Сделаны выводы о целесообразности использования этих показателей в технологической практике при выявлении недоброкачественной копченой рыбной продукции.

**Abstract.** The estimation of quality efficiency of smoked fish products at various modes of storage has been presented. The most objective indicators for quality efficiency of protein component of smoked fish products have been revealed: modification of fractional structure of proteins with combination of amine nitrogen determination and a degree of hydrolysis protein. The conclusions about advisability of using these indicators in technological practice have been made.

**Ключевые слова:** качество, копченая рыбопродукция, объективные показатели, степень гидролиза, денатурация белка, аминный азот, общий азот, микроорганизмы, водорастворимые белки, низко- и высокомолекулярные пептиды, оптическая плотность раствора

**Key words:** quality, smoked fish products, objective indicators, hydrolysis degree, melting of protein, amine nitrogen, general nitrogen, microbes, water-soluble proteins, low- and highmolecular peptides, optical density of solution

### 1. Введение

Важной задачей, стоящей перед агропромышленным комплексом России, является обеспечение населения страны качественными и безопасными продуктами питания. Рыбной продукции в решении этой проблемы отводится одно из ведущих мест, исходя из значимости в питании рыбы как поставщика незаменимых биологически ценных компонентов (Верстаков, 2009).

Копченая продукция считается одной из наиболее востребованных категорий рыбных продуктов, однако рыбная продукция горячего копчения имеет непродолжительный срок хранения (в соответствии с требованиями ГОСТ 7447-97 "Рыба горячего копчения" – не более 72 ч) при температуре от минус 2 до 2 °С (Кириллюк, 2008).

В последнее время для увеличения срока хранения рыбы горячего копчения используют исключительно замораживание, что негативно сказывается на ее вкусовых качествах.

Снижение качества тощих рыб происходит в основном из-за денатурации, частичного гидролиза и снижения влагоудерживающей способности белков, жирных – из-за гидролиза и окисления жиров. Известно, что в процессе хранения рыбной продукции происходят значительные изменения белкового компонента, от глубины этих изменений зависит ее пищевая ценность. Определяющим процессом в ходе гидролиза белков является накопление низкомолекулярных продуктов белковой деградации. Такие биохимические изменения происходят под воздействием собственных протеиназ, а также протеолитических ферментов размножающихся микроорганизмов (Мухин, Пискунович, 2011).

Действующая нормативная документация на рыбопродукцию горячего копчения не регламентирует биохимические показатели качества, поэтому мы полагаем, что определение

объективных показателей качества белковой составляющей для данного вида продукции представляет собой весьма актуальную задачу.

## 2. Материалы и методы

На протяжении многолетних исследований в лаборатории биохимии Полярного института морского рыбного хозяйства и океанографии (ПИНРО) оценивалась степень деградации белков различными способами. Объектами исследований являлись, главным образом, белки рыбного происхождения.

Использованы следующие критерии и методы: показатели степени гидролиза белков – соотношение аминного ( $N_{ам}$ ) и общего ( $N_{общ}$ ) азота; соотношение содержания свободных и связанных аминокислот; соотношение небелкового и общего азота ( $N_{нб}/N_{общ}$ ); изменение оптической плотности растворов при 280 нм; определение молекулярно-массового состава хроматографическими и электрофоретическими методами исследований (хроматография низкого давления; высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ); электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) (Мухин, Пискунович, 2011).

В целях выработки объективных биохимических критериев оценки качества копченой рыбной продукции и отражения степени деградации белковой составляющей проведены исследования, включающие в себя научно обоснованные подходы по изучению динамики объективных показателей качества в процессе холодильного хранения (от минус 1 до 2 °С) и хранения при комнатной температуре (от 20 до 22 °С). Предпринята попытка обнаружить корреляцию между изменениями белковой составляющей копченой продукции, с одной стороны, и ее органолептическими и микробиологическими показателями, с другой стороны.

В качестве объектов исследований мы использовали рыбную продукцию горячего копчения: зубатка пятнистая кусок, треска атлантическая кусок, окунь морской потрошенный обезглавленный.

Хранение рыбной продукции осуществляли в отдельном помещении на пластиковых противнях при комнатной температуре от 20 до 22 °С и при температуре от минус 1 до 2 °С (холодильное хранение).

При проведении анализов выполнялось 3-5 параллельных измерений. Графические и табличные данные представляют собой средние величины определяемых значений. Статистическую обработку результатов измерений проводили общепринятыми методами при доверительной вероятности  $p = 0,05$  (Дерфель, 1994).

Органолептическую оценку продукции проводили на рабочих дегустационных совещаниях по следующим показателям: механические повреждения, морщинистость кожи, увлажненность поверхности, белково-жировые натёки, цвет поверхности, равномерность окраски, степень готовности продукта, наличие запаха окислившегося жира, вкус, консистенция.

Были проведены микробиологические исследования образцов копченой продукции на содержание мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) по ГОСТ 10444.15-94 "Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов".

Определяли содержание аминного азота (АА), степени гидролиза белка (СГБ) и фракционного состава белков (ФСБ) в копченой рыбопродукции при холодильном хранении и хранении при комнатной температуре.

Содержание аминного (АА) и общего азота (ОА) определяли согласно требованиям ГОСТ 7636-85 "Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа".

Для определения степени деградации белковой составляющей рыбной продукции горячего копчения определяли СГБ мышечной ткани – отношение АА к ОА.

Для более точного определения глубины гидролиза были проведены исследования по выявлению изменений ФСБ в рыбной продукции горячего копчения в процессе хранения при различных условиях электрофоретическими и хроматографическими методами.

Электрофорез осуществлялся в денатурирующих условиях на пластинах с градиентным полиакриламидным гелем 8-18 %. В качестве маркеров использовали стандартные белки фирмы GE Healthcare (США) с известной молекулярной массой. Пластины окрашивали по Кумасси (Westermeyer, 1993). Электрофореграммы обрабатывали программой ImageJ.

При проведении гель-фильтрации в качестве неподвижной фазы в колонке (70 × 1,6 см) использовали Sephadex G-100 superfine (Pharmacia Biotech), элюент – 0,15 н NaCl с добавлением азида натрия. Хроматограммы обрабатывали программой Get Data Graph Digitizer (Остерман, 1981).

### 3. Результаты и обсуждение

Исследуемые образцы рыбопродукции горячего копчения характеризовались невысоким содержанием липидов и значительным содержанием белков. Химический состав рыбопродукции представлен в табл. 1.

Таблица 1. Химический состав образцов продукции горячего копчения (массовая доля, %)

Показатели	Зубатка пятнистая кусок	Треска атлантическая кусок	Окунь морской потрошенный обезглавленный
Вода	69,2	73,2	69,7
Зола	1,7	1,3	0,6
Липиды	4,2	0,3	6,8
Белки	23,3	22,8	21,3

Образцы трески и окуня горячего копчения имели хорошие органолептические показатели в течение всего срока холодильного хранения, однако у мышечной ткани окуня отмечено появление суховатой консистенции через 2 сут хранения. У образцов зубатки горячего копчения отмечено появление неприятного вкуса и слабого запаха окислившегося жира через 11 сут холодильного хранения.

Изменение содержания КМАФАнМ в образцах копченой продукции представлено в табл. 2.

Таблица 2. Изменение содержания КМАФАнМ (КОЕ/г) в образцах продукции горячего копчения

Вид продукции горячего копчения	Закладка на хранение	Режим хранения							
		от минус 1 до 2 °С				от 20 до 22 °С			
		2 сут	4 сут	8 сут	11 сут	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Зубатка кусок	$8,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$7,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^7$	$8,9 \times 10^7$
Треска кусок	$5,6 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	$8,9 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$2,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$	$n \times 10^{12}$	$n \times 10^{13}$
Окунь потрошенный обезглавленный	$1,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$n \times 10^{11}$	$n \times 10^{13}$

Качество рыбы при хранении ухудшалось по мере увеличения количества обсеменяющих ее микроорганизмов.

Микробиологические показатели образцов зубатки горячего копчения соответствовали установленным требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов" в течение 2 сут хранения, трески и окуня – в течение 4 сут холодильного хранения.

В процессе хранения при комнатной температуре отмечено превышение допустимого уровня содержания КМАФАнМ в образцах трески и окуня через 24 ч, в образцах зубатки – через 48 ч.

Автолитические превращения белков в рыбной продукции приводят к увеличению содержания АА, а также СГБ. Динамика содержания АА и СГБ представлена в табл. 3 и 4.

Таблица 3. Изменение содержания АА (мг/100 г) в образцах продукции горячего копчения

Вид продукции горячего копчения	Закладка на хранение	Режим хранения							
		от минус 1 до 2 °С				от 20 до 22 °С			
		2 сут	4 сут	8 сут	11 сут	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Зубатка кусок	298	305	322	349	364	270	341	376	395
Треска кусок	285	289	320	326	335	352	332	405	417
Окунь потрошенный обезглавленный	263	267	279	305	323	321	338	319	327

В мышечной ткани рыб наблюдались изменения содержания АА, которые зависели от условий хранения. В процессе холодильного хранения рыбной продукции эти изменения были менее резкими, чем в хранении при комнатной температуре, что вполне закономерно и лишний раз подтверждает объективность данного показателя.

Таблица 4. Изменение показателя СГБ (%) в образцах продукции горячего копчения

Вид продукции горячего копчения	Режим хранения								
	Закладка на хранение	от минус 1 до 2 °С				от 20 до 22 °С			
		2 сут	4 сут	8 сут	11 сут	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Зубатка кусок	8,0	8,7	9,3	9,8	10,2	9,2	9,3	10,2	10,9
Треска кусок	7,8	8,0	8,8	9,2	9,5	9,4	9,4	11,4	11,9
Окунь потрошенный обезглавленный	7,7	7,1	8,4	8,4	8,5	9,4	9,5	9,8	10,4

Интенсивность гидролитических процессов при комнатном хранении изменялась в обратной зависимости от содержания белка и нарастала в ряду: зубатка – треска – окунь (что подтверждалось изменением количества КМАФАНМ). При комнатной температуре в тканях рыб отмечены глубокие изменения белковой составляющей: у зубатки и окуня через 24 ч, у трески – через 72 ч. Значения показателя СГБ за этот период выросли более, чем на 15 %. Тенденция плавного роста СГБ в мышечной ткани сохранялась при холодильном хранении у всех исследуемых образцов.

При исследовании ФСБ методом электрофореза анализировались саркоплазматические водорастворимые белки и рассмотрены три фракции: высокомолекулярные (ВМБ) – с молекулярной массой 150 кДа и выше, среднемолекулярные (СМБ) – с молекулярной 60-150 кДа, низкомолекулярные (НМБ) – с молекулярной 60 кДа и ниже.

Изменение соотношения белковых фракций в образцах продукции горячего копчения представлены на рис. 1 и 2.

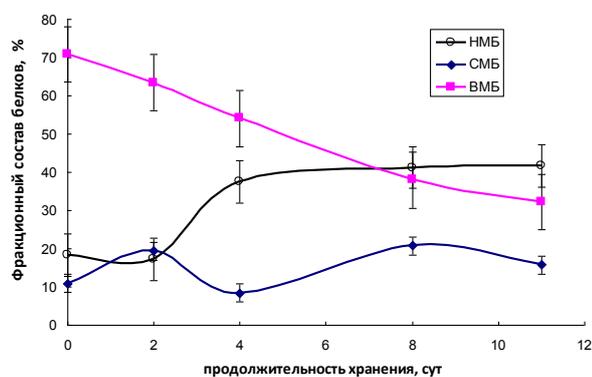


Рис. 1. Изменение соотношения фракционного состава белков (%) образцов продукции горячего копчения (средние значения) при холодильном хранении

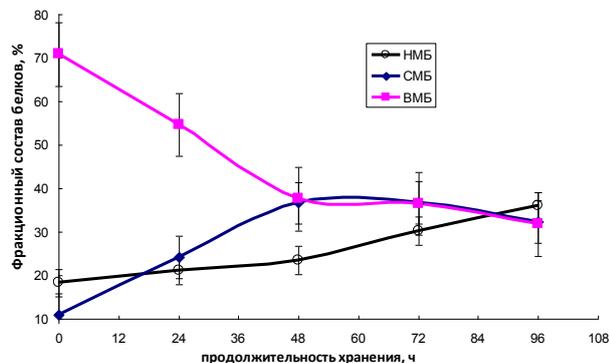


Рис. 2. Изменение соотношения фракционного состава белков (%) образцов продукции горячего копчения (средние значения) при хранении при комнатной температуре

Общей характеристикой ФСБ мышечной ткани исследуемых образцов рыбной продукции являлось то, что более половины белков представлены ВМБ (более 68 %).

При холодильном хранении значительные изменения фракционного состава (уменьшение ВМБ более, чем в 2 раза) в ходе хранения выявлены у зубатки через 4 сут, у трески – через 8 сут хранения и через 11 сут – у окуня. При дальнейшем холодильном хранении до 11 сут отмечены незначительные изменения фракционного состава в тканях зубатки и трески. По-видимому, это объясняется тем, что по истечении 4 сут хранения у зубатки и 8 сут хранения у трески происходило резкое снижение растворимости белков за счет их массовой денатурации.

В процессе комнатного хранения доля ВМБ мышечной ткани зубатки уменьшилась более чем в 1,5 раза уже через 24 ч и максимально уменьшилась, более чем в 5 раз, через 96 ч, на фоне роста доли НМБ по сравнению с исходными показателями. В мышечной ткани остальных исследуемых образцов уменьшение ВМБ было менее выражено: аналогичное снижение растворимости белков было отмечено у трески через 48 ч, у окуня – через 24 ч комнатного хранения. Эти изменения свидетельствуют о том, что в процессе хранения рыбной продукции при температуре от 20 до 22 °С происходили автолитические превращения белков под воздействием тканевых протеолитических ферментов.

В процессе холодильного хранения в тканях трески на 4 сут и в тканях окуня на 2 сут содержание СМБ сначала несколько снижалось (вероятно, из-за их распада на низкомолекулярные звенья), а затем при дальнейшем хранении возрастало (очевидно, благодаря распаду

высокомолекулярных фракций). В мышечной ткани зубатки содержание СМБ с 2 до 11 сут практически не изменялось.

При комнатном хранении пул СМБ достигал своего пика в мышцах трески через 48 ч, в мышечной ткани окуня через 72 ч. Скорее всего, это объясняется взаимодействием компонентов копильного дыма с белками мяса, что, по-видимому, могло повлиять на результаты проводимого анализа.

Результаты исследований ФСБ методом хроматографии представлены в табл. 5.

Таблица 5. Изменение ФСБ в рыбной продукции горячего копчения при различных режимах хранения, в % от суммарного содержания растворимых белков (метод хроматографии)

Наименование фракции	Режим хранения								
	Закладка на хранение	от минус 1 до 2 °С				от 20 до 22 °С			
		2 сут	4 сут	8 сут	11 сут	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Зубатка кусок									
НМБ	79,0	76,2	75,1	75,5	78,7	80,8	85,9	89,4	91,2
СМБ	13,5	13,5	15,6	15,3	13,1	10,1	6,2	3,6	2,7
ВМБ	7,5	10,3	9,6	9,2	8,2	9,1	7,9	7,1	6,1
Треска кусок									
НМБ	56,3	67,8	68,3	63,4	64,2	71,2	65,3	72,2	72,3
СМБ	31,5	9,4	9,7	14,8	13,6	12,6	12,9	11,3	7,3
ВМБ	12,2	22,8	22,0	21,8	22,2	16,2	21,8	16,5	20,4
Окунь потрошенный обезглавленный									
НМБ	48,3	54,2	52,9	65,8	68,5	72,6	77,5	53,4	60,3
СМБ	20,0	11,1	11,4	11,8	13,2	17,1	14,3	11,2	11,0
ВМБ	31,7	34,7	35,6	22,3	18,3	10,4	8,3	35,4	28,8

На основании анализа полученных хроматограмм белков мышечной ткани исследуемых гидробионтов рассчитаны доли фракций белков (ВМБ, СМБ, НМБ).

В результате анализа было установлено, что при закладке на хранение общей характеристикой ФСБ являлось преобладание низкомолекулярной фракции белка (НМБ). Так, в белках зубатки их количество достигало 79 %, трески – 56 %, окуня – 48 %. В то время как высокомолекулярный пул составлял соответственно 8 %, 12%, 32 %.

В процессе хранения количество НМБ в мышечной ткани исследуемых рыб увеличивалось, и скорость таких изменений напрямую зависела от двух главных факторов (температура и длительность хранения).

В процессе холодильного хранения значительное увеличение НМБ произошло на 2 сут у трески, на 8 сут – у окуня. В тканях зубатки эти изменения незначительны. При дальнейшем холодильном хранении до 11 сут изменения содержания НМБ менее выражены.

При комнатной температуре в мышечной ткани окуня на фоне роста НМБ отмечено уменьшение ВМБ более чем в 3 раза по сравнению с исходным содержанием уже через 24 ч. Незначительное уменьшение ВМБ на фоне плавного увеличения НМБ в тканях зубатки было установлено в течение всего срока хранения при температуре от 20 до 22 °С.

Более глубокие изменения в ФСБ отмечены в тканях окуня по сравнению с зубаткой при комнатной температуре хранения. Мы связываем это с общим содержанием белка, которое в мышцах окуня выше, чем в мышцах зубатки.

Так, количество НМБ в тканях окуня возросло более чем в 1,5 раза уже через 24 ч хранения, по сравнению с исходным содержанием, и сократилось почти до первоначального уровня через 72 ч. В мышечной ткани трески количество НМБ увеличилось в 1,3 раза через 24 ч.

В результате лабораторных исследований были выявлены устойчивые корреляции изменения показателей белковой составляющей и микробиологических показателей рыбной продукции горячего копчения:

– при холодильном хранении изменение содержания АА (мг/100 г) и КМАФАНМ, Ig(КОЕ/г) в мышечной ткани (рис. 3); изменение содержания НМБ (%) (электрофоретический метод) и показателя СГБ, (%) в мышечной ткани (рис. 4);

– при хранении при комнатной температуре изменение содержания НМБ (%) (метод электрофореза), АА (мг/100 г) и КМАФАНМ, Ig(КОЕ/г) в мышечной ткани (рис. 5 и 6).

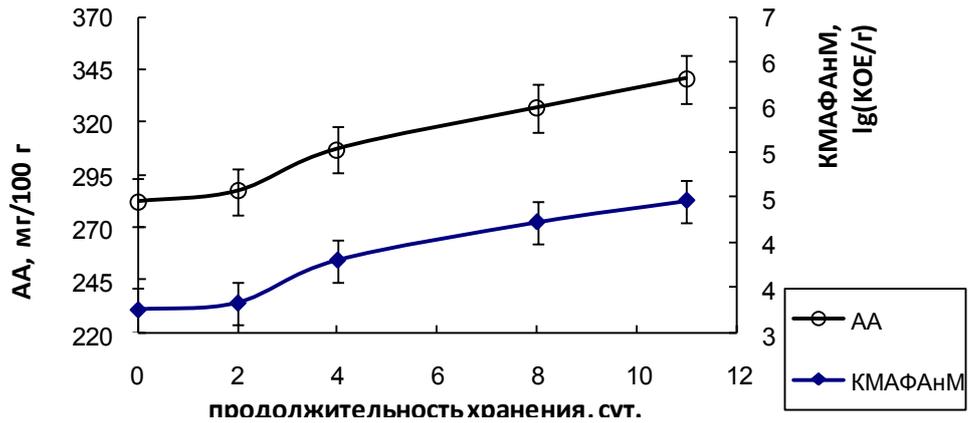


Рис. 3. Динамика изменения содержания аминокислотного азота (мг/100 г) и количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, lg(COE/г) (средние значения) в рыбной продукции горячего копчения в процессе холодильного хранения

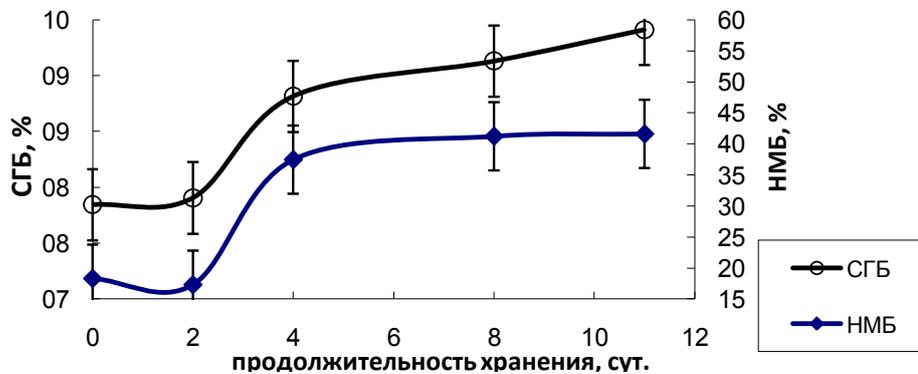


Рис. 4. Динамика изменения содержания низкомолекулярной фракции белка (%) и показателя степени гидролиза белка (%) (средние значения) в рыбной продукции горячего копчения в процессе холодильного хранения

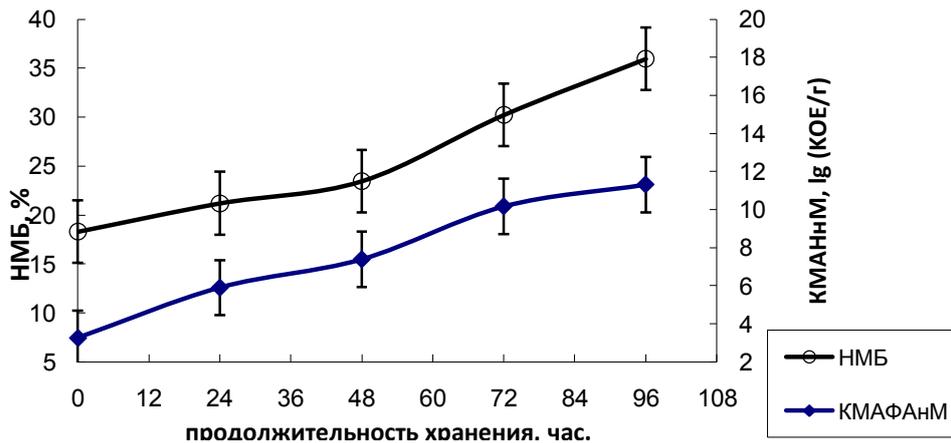


Рис. 5. Динамика изменения содержания низкомолекулярной фракции белка (%) и количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, lg(COE/г) (средние значения) в рыбной продукции горячего копчения в процессе хранения при комнатной температуре

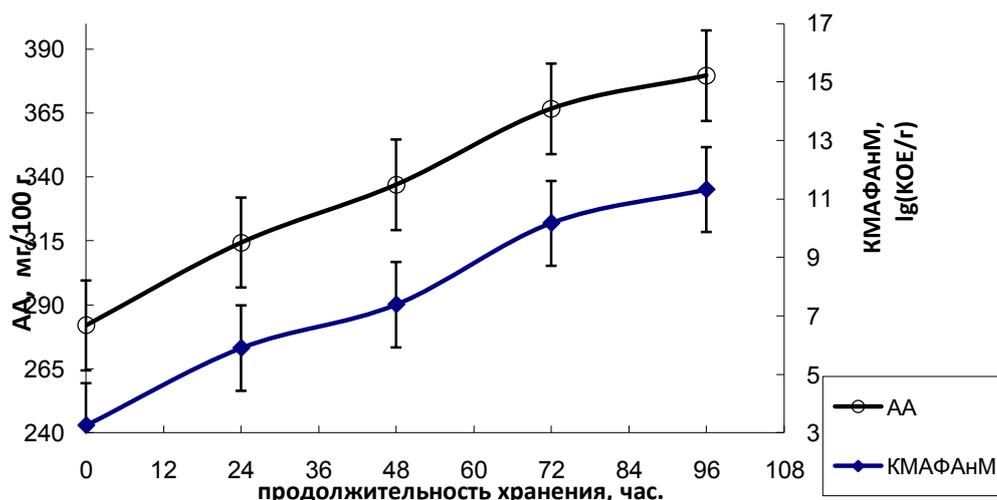


Рис. 6. Динамика изменения содержания аминного азота (мг/100 г) и количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, лг(КОЕ/г) (средние значения) в рыбной продукции горячего копчения в процессе хранения при комнатной температуре

#### 4. Заключение

В целях осуществления эффективного контроля качества рыбной продукции горячего копчения представляется целесообразным в комплексе определять следующие показатели, которые мы выделили в разряд объективных: АА, СГБ, ФСБ различными методами (хроматография и электрофорез).

Показатель СГБ, учитывающий различный химический состав исследуемых образцов (содержание белка), наиболее объективно отражает изменения белковой составляющей при холодильном хранении и хранении при комнатной температуре. Интенсивность гидролитических процессов при комнатной температуре изменяется в обратной зависимости от содержания белка и нарастает в ряду: зубатка – треска – окунь.

На основании проведенных исследований можно заключить, что комплексное использование таких показателей качества как АА, СГБ, ФСБ при корреляции с микробиологическими показателями является надежным инструментом для выявления степени деградации белковой составляющей в копченой рыбной продукции, а следовательно, отражает качество рыбопродукции при различных режимах хранения.

#### Литература

- Westermeier Reiner.** Electrophoresis in practice: A guide to theory and practice. *In collab. with Neil Barnes.* Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo, VCH, 277 p., 1993.
- Верстаков А.А.** Формирование улучшенных характеристик рыбы горячего копчения путем совершенствования технологии ее производства. Дис. ... канд. техн. наук: 05.18.15. Моск. гос. ун-т пищевых пр-в (МГУПП). М., 156 с., 2009.
- Дерфель К.** Статистика в аналитической химии. М., Мир, 268 с., 1994.
- Кирилук О.А.** Разработка номенклатуры потребительских свойств, сроков годности и условий хранения подкопченной и слабосоленой рыбной продукции. Дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04, 05.18.15. МГТУ. Мурманск, 253 с., 2008.
- Мухин В.А., Пискунович Д.И.** Сравнительная оценка методов определения степени расщепления белков. Тез. докл. V Российский симпозиум "Белки и пептиды". Петрозаводск, Ин-т биологии Карельского науч. центра РАН, с. 214, 2011.
- Остерман Л.А.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М., Наука, 288 с., 1981.