

Jacek NIEDŹWIEDŹ, Halina OSTOJA, Tomasz ŻMIJEWSKI, Marek CIERACH

e-mail: jacek.niedzwiedz@uwm.edu.pl

Katedra Technologii i Chemii Mięsa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Porównanie metod oznaczania zawartości glikogenu w wołowej tkance mięśniowej

Wstęp

Glikogen jest polisacharydem zbudowanym z cząsteczek glukozy i stanowi materiał zapasowy mięśni szkieletowych wszystkich ssaków. Za życia zwierzęcia energia produkowana jest głównie na drodze przemian tlenowych glikogenu. Jednak w sytuacjach silnie stresogennych lub na skutek intensywnego wysiłku, kiedy występuje deficyt tlenu, aktywacji w mięśniach ulega szlak przemian beztlenowych. W wyniku przemian beztlenowych z glikogenu produkowany jest kwas mlekowy. Podobnie dzieje się po uboju, kiedy do tkanek nie dociera tlen [1]. Zawartość tego składnika w mięśniach tuż przed ubojem zwierzęcia jest niezwykle ważna z technologicznego punktu widzenia, gdyż wartość *pH* jest jednym z głównych czynników wpływających na jakość mięsa.

Zawartość glikogenu w mięśniach jest wysoce zmienna i zależy od wielu czynników, wśród których wyróżnić można gatunek, żywienie, rodzaj mięśnia [1]. W mięśniu *longissimus* bydła wynosi ona od 60 do 100 mmol/kg tkanki [2], dla porównania w mięśniach świń wartość ta wynosi około 85 mmol/kg, a w mięśniach koni jest ona przeważnie 1,5-krotnie większa od zawartości w mięśniach bydła [1]. Różni badacze prowadzą oznaczanie zawartości glikogenu zarówno w tkance mięśniowej jak i wątrobie, stosując odmienne techniki. Często stosowana jest metoda antronowa [3–6]. W wielu pracach skupiających się na badaniu poubojowego metabolizmu w wołowej tkance mięśniowej, stosowano metody enzymatyczne oznaczania glikogenu [2, 7–9]. Na uwagę zasługuje także możliwość wykorzystania glukometru do pomiaru zawartości glikogenu w tkance mięśniowej [10–12]. W literaturze spotyka się także prace, w których do oznaczania zawartości glikogenu mięśniowego posłużono się metodą z jodkiem potasu [13, 14].

Celem pracy było oznaczenie zawartości glikogenu mięśniowego przy zastosowaniu trzech metod, a także porównanie otrzymanych wyników.

Materiał badawczy i metodyka

Materiałem do badań był mięsień *longissimus thoracis et. lumborum* pochodzący z tusz buhajków ($n = 7$), mieszańców ras czarno-biała z *limousin*, o masie przedubojowej $655,43 \pm 86,59$ kg, w wieku $18,42 \pm 3,74$ miesięcy. Rostbef wycinano z tuszy 45 minut po uboju i po zapakowaniu próżniowym przechowywano w warunkach chłodniczych. W ustalonych odstępach czasu tj. 45 min, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h *post mortem* pobierano próbki i zamrażano je w ciekłym azocie w celu zatrzymania przebiegu zmian pośmiertnych. Następnie w zamrożonych próbkach oznaczano zawartość glikogenu trzema metodami: metodą antronową, metodą enzymatyczną, a także metodą z wykorzystaniem glukometru. Wyniki podano w mg/100 g tkanki.

Oznaczenie zawartości glikogenu metodą antronową [15, 16]

Odważano 2,5 g mięsa, przenoszono do próbki grubościenną, dodawano 5 ml 60% roztworu wodorotlenku sodu i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej aż do całkowitego rozpuszczenia. Po oziębieniu dodawano 5 ml wody i kilka kropli stęż. kwasu siarkowego. Glikogen wytrącano 40 ml 96% alkoholu etylowego. Całość pozostawiano na 24 h, a następnie odwirowywano przy 3000 obr./min. przez 30 min. Płyn z osadu dekantowano, osad przemywano używając po 15 ml coraz to bardziej stężonego roztworu alkoholu etylowego, tj. 60, 80 i 96% i ponownie

odwirowywano. Na koniec osad przemywano eterem etylowym, odparowując jego resztki na łaźni wodnej. Do przemytego osadu dodawano 5 ml gorącej wody, zawartość próbki zobojętniano stężonym kwasem solnym wobec papierka wskaźnikowego. Roztwór glikogenu przenoszono ilościowo do kolby miarowej poj. 50 ml i uzupełniano wodą do kreski. W celu przeprowadzenia reakcji barwnej pobierano do próbki z doszlifowanym korkiem 0,5–1,5 ml roztworu, dopełniano wodą do 5 ml. Następnie ostrożnie wlewano do próbki 10 ml roztworu antonu. Roztwór ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 10 min. Natężenie barwy oznaczano kolorymetrycznie przy długości fali 620 nm.

Oznaczenie zawartości glikogenu-glukozy z wykorzystaniem glukometru [10]

Odważano 0,5 g rozdrobnionego mięsa pozbawionego tłuszczu i tkanki łącznej do fiolki o pojemności 10 ml, a następnie dodawano 2 ml 2N HCl. Fiolki zamykano termicznie i ogrzewano w suszarce w temp. 85–90°C przez 2 h w celu przeprowadzenia hydrolizy. Następnie próbki schładzano i sączono. Przesącz neutralizowano roztworem 2N NaOH do wartości *pH* 7,0–7,3. Próbkę doprowadzano do temperatury 38°C i przeprowadzano pomiar stężenia glukozy za pomocą glukometru.

Oznaczenie zawartości glikogenu metodą enzymatyczną [17]

Do oznaczenia zawartości glikogenu wykorzystano gotowe zestawy enzymatyczne (*BioVision, Inc.*, USA) i postępowano zgodnie z dołączoną procedurą. Homogenizowano 10 mg mięsa z 200 µl wody destylowanej (na lodzie). Homogenat ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min w celu inaktywacji enzymów. Próbkę odwirowywano przy 13000 obr./min. przez 5 min. Pobrano 10 µl próbki i uzupełniano do objętości 50 µl *Glycogen Hydrolysis Buffer*, następnie dodawano 2 µl *Glycogen Hydrolysis Enzyme Mix*, mieszano i inkubowano w temp. pokojowej przez 30 min. Do każdej próbki dodano 50 µl roztworu zawierającego: *Glycogen Development Buffer* 46 µl, *Glycogen Development Enzyme Mix* 2µl, *OxiRed Probe* 2µl i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min., chroniąc przed światłem. Pomiar kolorymetryczny wykonywano przy długości fali 570 nm.

Omówienie wyników

Podstawowym parametrem jakości mięsa jest wartość *pH*. Na tempo i rozmiar obniżenia wartości *pH* mięsa wpływa wiele czynników m.in. gatunek, płeć, rasa, zmienność osobnicza, stres przedubojowy, warunki wychładzania tusz oraz przechowywania mięsa [18, 19].

W analizowanym mięśniu, wartość *pH* ulegała stopniowemu obniżeniu wraz z upływem czasu od 6,55 po 45 min. do 5,44 po 48 h od uboju. O końcowej wartości *pH* mięsa decyduje ilość produkowanego z glikogenu w wyniku procesu beztlenowej glikolizy, mleczanu. Oznaczony w badanym mięśniu poziom zawartości glikogenu 45 min. p.m. wynosił: 835,38; 587,56; 661,95 mg/100 g odpowiednio dla metody antronowej, enzymatycznej i z wykorzystaniem glukometru. Wraz z upływem czasu wykazano stopniowe obniżenie zawartości w zależności od zastosowanej procedury do poziomu 153,55; 254,86; 286,49 po 48 h od uboju.

Tab. 1. Wartość *pH* mięśnia *longissimus thoracis et lumborum* oraz zawartość glikogenu [mg/100g] oznaczona trzema metodami: antronową, z wykorzystaniem glukometru i enzymatyczną (wartości średnie \pm odchylenie standardowe)

Czas post mortem	Wartość <i>pH</i>	Zawartość glikogenu [mg/100 g]		
		metody		
		antronowa	glukometr	enzymatyczna
45 [min]	6,55 ^a $\pm 0,11$	835,38 ^{x,a} $\pm 204,91$	661,95 ^{x,a} $\pm 380,88$	587,56 ^{x,a} $\pm 257,77$
3 [h]	6,23 ^b $\pm 0,23$	677,40 ^{x,b} $\pm 179,66$	589,74 ^{x,a,b} $\pm 324,79$	608,98 ^{x,a} $\pm 135,38$
6 [h]	5,93 ^c $\pm 0,40$	597,21 ^{x,b} $\pm 17,54$	512,48 ^{x,a,b} $\pm 332,09$	460,40 ^{x,a} $\pm 204,93$
12 [h]	5,73 ^{c,d} $\pm 0,17$	420,46 ^{x,c} $\pm 124,88$	522,86 ^{x,ab} $\pm 346,41$	452,19 ^{x,a} $\pm 183,63$
24 [h]	5,49 ^{d,e} $\pm 0,07$	212,28 ^{x,d} $\pm 48,80$	363,76 ^{x,a,b} $\pm 223,36$	256,61 ^{x,b} $\pm 97,64$
48 [h]	5,44 ^e $\pm 0,03$	153,55 ^{x,d} $\pm 29,57$	286,49 ^{y,b} $\pm 118,52$	254,86 ^{y,b} $\pm 77,66$

^{x,y} – wartości w wierszach oznaczone różnym indeksem w obrębie metod różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

^{a,b,c,d,e} – wartości poszczególnych parametrów w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Wprawdzie nie odnotowano istotnych różnic między poszczególnymi metodami, to jednak można zauważyć dużą zmienność w zawartości glikogenu oznaczonej każdą z metod. Przyczyną wystąpienia tych różnic może być np. duża zmienność osobnicza. Dlatego też nie można jednoznacznie stwierdzić, które z zastosowanych w doświadczeniu procedur dają lepsze rezultaty w ilościowym oznaczeniu zawartości węglowodanów w tkance mięśniowej. W literaturze tematu stosuje się w równym stopniu metodę antronową [3–6], która jest długotrwała i pracochłonna, a zaletą jej jest natomiast niewielki koszt i duża precyzyjność, jak i metodę enzymatyczną [2, 7–9, 20]. Metoda enzymatyczna z dobrym skutkiem jest wykorzystywana do oznaczania zawartości glikogenu mięśniowego w próbkach pobranych metodą biopsji [3, 5, 6]. Hydroliza enzymatyczna glikogenu przedstawiana jest jako alternatywna technika analizy stężenia glikogenu, jednak aktywność użytych w tej procedurze enzymów może wpływać różnicująco na uzyskane wyniki, ponadto należałoby podkreślić, że koszt jednostkowy enzymów jest wysoki.

W omawianej pracy podjęto się sprawdzenia, czy nowatorska metoda z wykorzystaniem glukometru zaproponowana przez Hargreaves i in. [10], która jest szybka, tania oraz niewymagająca dużych nakładów pracy, nadaje się do precyzyjnego oznaczania zawartości glikogenu. Metoda oparta jest na kwaśnej hydrolizie próbki, a następnie neutralizacji roztworu i odczycie zawartości glukozy przy użyciu glukometru stosowanego do pomiaru poziomu zawartości glukozy we krwi. Hargreaves i in. [10] w eksperymencie porównali dokładność tej metody i metody miareczkowej. Zaobserwowano znaczące różnice między uzyskanymi wynikami zawartości glukozy zmierzonej glukometrem i oznaczonej metodą miareczkową, w porównaniu z próbkami o znanej zawartości glukozy. Jednakże po zidentyfikowaniu i wyeliminowaniu źródła niezgodności, obserwowane różnice między wynikami otrzymanymi z dwóch metod były statystycznie nieistotne.

Na podstawie własnych pomiarów zaobserwowano potencjalne możliwości jej wykorzystania do wstępnego szacowania poziomu zawartości glikogenu w tkance mięśniowej ze względu na prostotę procedury jak i krótki czas trwania oznaczenia.

Do oznaczania zawartości glikogenu, glukometr wykorzystali również Young i in. [12]. Metodę swoją, która została opatentowana, oparli na szybkiej enzymatycznej hydrolizie glikogenu mięśniowego do glukozy, a następnie pomiarze stężenia uwolnionej glukozy przy użyciu glukometru służącego diabetykom do pomiaru stężenia glukozy we krwi.

W czasie 24 h *post mortem* obniżenie zawartości glikogenu mierzonej po zhydrolizowaniu do glukozy było zbliżone z obniżaniem wartości *pH*. W tym samym czasie oznaczano stężenie mleczażu w mięśniach w celu oszacowania potencjału glikolitycznego. Krótki czas przeprowadzenia oznaczenia umożliwia, zdaniem cytowanych autorów, zastosowanie tej metody do bezpośredniego pomiaru potencjału glikolitycznego jeszcze w okresie *prerigor*, a na jego podstawie szacowania końcowej wartości *pH*. Technologia ta znajduje głównie zastosowanie w przypadku prowadzenia rozbioru tusz na ciepło, kiedy po zapakowaniu elementów nie ma możliwości kontrolowania ich wartości *pH*.

Podsumowanie

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że metoda antronowa w sposób prawidłowy pozwoliła ocenić przebieg zmian zawartości glikogenu w mięsie wołowym w czasie dojrzewania. Natomiast metoda z wykorzystaniem glukometru wymaga dalszych prac, jednakże stwarza potencjalne możliwości wykorzystania jej do wstępnego szacowania poziomu zawartości glikogenu w wołowej tkance mięśniowej.

LITERATURA

- [1] A. R. Pösö, E. Puolanne: Meat Sci. **70**, 423 (2005).
- [2] K. Immonen, R. G. Kauffman, D. M. Schaefer, E. Poulanne: Meat Sci. **54**, 163 (2000).
- [3] H. Ostojka, W. Korzeniowski, M. Cierach: Inż. Rol. **9**(20), 233 (2000).
- [4] K. Reyes-Gordillo, J. Segovia, M. Shibayama, V. Tsutsumi, P. Vergara, M. G. Moreno, P. Muriel: Fund. Clin. Pharmacol. **22**, 417 (2008).
- [5] Y. Chun, Z. D. Yin: J. Clin. Microbiol. **36**, 1081 (1998).
- [6] E. Chávez, J. Segovia, M. Shibayama, V. Tsutsumi, P. Vergara, L. Castro-Sánchez, E. Pérez Salazar, M. G. Moreno, P. Muriel: Liver Int. **30**, 969 (2010).
- [7] K. Immonen, E. Poulanne: Meat Sci. **55**, 279 (2000).
- [8] K. Immonen, M. Ruusunen, K. Hissa, E. Poulanne: Meat Sci. **55**, 25 (2000).
- [9] K. Immonen, D. M. Schaefer, E. Poulanne, R. G. Kauffman, E. V. Nordheim: Meat Sci. **54**, 155 (2000).
- [10] A. Hargreaves B., L. Barrales V., D. Barrales Z., J. L. Riveros F., I. Peña R.: Chilean JAR, **69**(3), 366 (2009).
- [11] O. A. Young, R. D. Thomson, V.G. Merhtens, M. P. F. Loeffen: Meat Sci. **67**, 107 (2004).
- [12] O. A. Young, J. West, A. L. Hart, F. F. H. van Otterdijk: Meat Sci. **66**, 493 (2004).
- [13] M. S. Rhee, Y. C. Ryu, B. C. Kim: Asian-Aust. J. Anim. Sci. **15**, 1747 (2002).
- [14] L. H. Yu, D. G. Lim, S. G. Jeong, T. S. In, J. H. Kim, C. N. Ahn, C. J. Kim, B. Y. Park: Meat Sci. **79**, 64 (2008).
- [15] U. Rutkowska: Praca zbiorowa. Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. PZW, Warszawa 1981.
- [16] B. Dzierżyńska-Cybulko, J. Kijowski: Zarys przetwórstwa surowców zwierzęcych. Wyd. AR, Poznań 1982.
- [17] BioVision, Inc., USA: <http://www.biovision.com/manuals/K646-100.pdf>
- [18] J. Niedźwiedź, M. Cierach: Gosp. Mięsna nr 4, 14 (2009).
- [19] M. Cierach, J. Niedźwiedź, M. Borzyszkowski: Inż. Ap. Chem. **48**, nr 2, 27 (2009).
- [20] J. T. Keeton, H. Benli, A. E. Clafin Carbohydrates w Handbook of Muscle Foods Analysis. CRC Press, Boca Raton, London, New York 2009.

Pracę wykonano w ramach projektu Optymalizacja produkcji wołowiny w Polsce zgodnie ze strategią „od widelca do zagrody”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, lata 2007-2013 - Priorytet I „Badania i rozwój nowoczesnych technologii”, Działanie 1.3 „Wsparcie projektów B+R na rzecz przedsiębiorców realizowanych przez jednostki naukowe”, Poddziałanie 1.3.1 „Projekty rozwojowe”, nr umowy: UDA-POIG.01.03.01-00-204/09-03