

ENZIMATSKO ODREĐIVANJE GLIKOLITIČKOG POTENCIJALA – POUZDANA METODA ZA PREDVIĐANJE KVALITETE MESA

ENZYMATIC ASSAY FOR GLYCOLITIC POTENTIAL DETERMINATION – A RELIABLE METHOD FOR MEAT QUALITY PREDICTION

Senka Majić, Rosemary Vuković, Anamarija Šter, Elizabeta Has-Schön

Stručni članak
Primljeno: 10. ožujak 2011.

SAŽETAK

Prelaz mišića u meso složen je biokemijski proces ovisan o različitim parametrima. Kako bi se proizvelo što kvalitetnije meso privlačno kupcima, potrebno je poznavati biokemijske promjene koje se događaju u mišićnom tkivu *ante mortem*, odnosno *post mortem*. Izraz glikolitički potencijal označava potencijal pojedinog mišića za stvaranje laktata. Laktat i glikogen (potencijalni izvor dodatnog laktata) u mišićnom tkivu mogu se precizno izmjeriti enzimskim metodama. U ovome radu je sažeto opisana enzimatska metoda za određivanje glikolitičkog potencijala.

Ključne riječi: *glikolitički potencijal, kvaliteta mesa, glukoza, laktat*

UVOD

Glikolitički potencijal (GP)

Kvaliteta mesa se određuje mjerenjem tehnoloških parametara poput boje i sposobnosti vezanja vode, koji najviše utječu na privlačnost mesa kupcu. Ovi pokazatelji su pod direktnim utjecajem promjene kiselosti (pada pH vrijednosti) koja prati biokemijske procese prelaska mišićnog tkiva u meso. Zato se u novije vrijeme, uz spomenute parametre kvalitete, nastoji također odrediti i GP kao važan podatak u nastojanjima za poboljšanje kvalitete mesa i mesnih proizvoda. GP se može definirati kao zbir onih sastojaka mišićnog tkiva koji se mogu prevesti u laktat, kao i koncentracije već postojećeg laktata u tome tkivu. Danas se u te svrhe uspješno koristi enzimatska metoda koja će u ovom radu biti detaljno opisana.

Metabolizam glukoze i GP

Metabolizam glukoze i glikogena u životinjskim mišićima je složen i obuhvaća sljedeće metaboličke procese: glikolizu (razgradnja glukoze do piruvata odnosno laktata), glukoneogenezu (sinteza glukoze iz neugljikohidratnih preteča poput laktata i piruvata), glikogenezu (sinteza glikogena), te glikogenolizu (razgradnja glikogena), a prikazan je na slici 1.

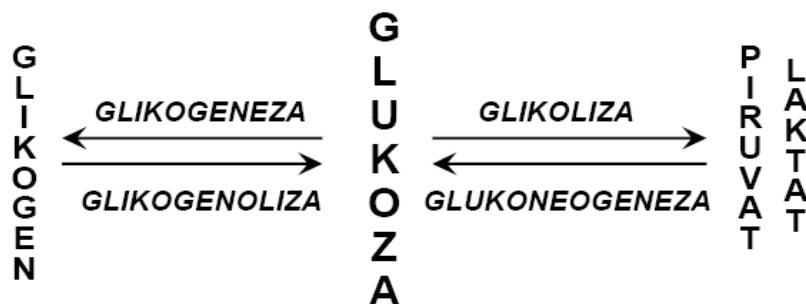
Glikogen, polimer glukoze, je izuzetno važan oblik brzo raspoložive energije u životinjskim stanicama. Najviše ga ima u mišićima, premda mu je koncentracija veća u jetri, ali se manje količine mogu naći i u drugim tkivima (Nelson i Cox, 2005). Količina

Senka Majić, prof. biol. i kemije, Rosemary Vuković, prof. biol. i kemije, Anamarija Šter, student, Izv. prof. dr. sc. Elizabeta Has-Schön, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku, Odjel za biologiju, Trg Lj. Gaja 6, 31000 Osijek.

glikogena u nekom tkivu ovisi o količini glikogenina u početnoj fazi sinteze glikogena (Alonso i sur., 1995). U mišićima glikogen služi isključivo kao izvor energije potrebne za mišićnu aktivnost (Nelson i Cox, 2005), dok u jetri ima zadaću održavanja koncentracije glukoze u krvi u normalnim granicama (Roach, 2002). To se postiže različitim kinetičkim osobinama enzima *heksokinaze* (mišić) i *glukokinaze* (jetra), koji kataliziraju istu, prvu reakciju glikolize – fosforilaciju glukoze. Glikogen nema stalnu molekulska masu jer je podložan neprekidnim dinamičkim procesima sinteze i razgradnje, ovisno o donosu glukoze u organizam hranom, te utrošku glukoze u metaboličkim procesima i mišićnoj kontrakciji. Glikogen se razgrađuje i nakon smrti životinje (postmortalna glikoliza) što značajno utječe na složen proces prelaska mišića u meso, tj. na kvalitetu nastalog mesa.

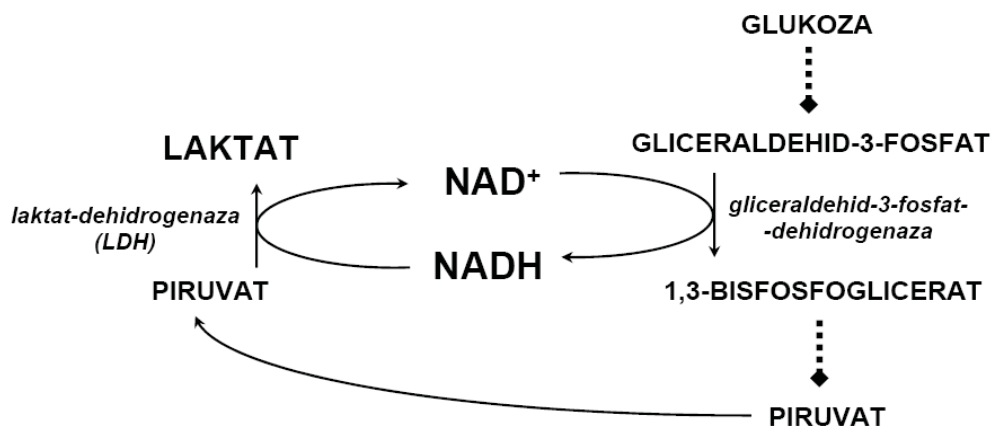
Anaerobna glikoliza

Glikoliza je metabolički proces razgradnje glukoze do piruvata (ionizirani oblik pirogroždane kiseline koji dominira pri fiziološkom pH). Odvija se u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U aerobnim uvjetima nastali piruvat se pregrađuje u acetil-CoA i ulazi u ciklus limunske kiseline i oksidativnu fosforilaciju, te u konačnici predstavlja izvor energije koja se oslobađa u obliku brojnih molekula ATP-a (Berg i sur., 2006). U anaerobnim uvjetima, piruvat se pregrađuje u laktat (ionizirani oblik mliječne kiseline koji dominira pri fiziološkom pH). Glikoliza se može odvijati u anaerobnim uvjetima sve dok se ne utroši raspoloživa količina glukoze (dakle i glikogena), zahvaljujući činjenici da se prilikom redukcije piruvata u laktat oksidoreduktivni kofaktor NADH obnavlja u svom oksidiranom obliku NAD⁺, koji je neophodan u jednoj od reakcija glikolize (Mayes i Bender, 2003, Slika 2):



Slika 1. Metabolizam glukoze i glikogena u mišićnom tkivu.

Figure 1. Metabolism of glucose and glycogen in muscle tissue



Slika 2. Povezanost anaerobne glikolize i redukcije piruvata u laktat.

Figure 2. Correlation between anaerobic glycolysis and pyruvate reduction into lactate

Veća količina glikogena u mišićnom tkivu rezultirat će nakon smrti životinje intenzivnijom anaerobnom glikolizim i povećanom koncentracijom laktata, tj. nižom pH vrijednosti i lošijom kvalitetom mesa. Osim ovog osnovnog i najvažnijeg, i neki drugi parametri dodatno utječu na konačni pH i kvalitetu mesa.

Metode za određivanje GP-a

Ključni dio postupka određivanja GP-a je mjerenje koncentracije glukoze sadržane u mišićnom glikogenu. Klasične metode koriste prethodni postupak ekstrakcije glikogena iz tkiva pomoću lužine (npr. kalijevim hidroksidom) ili kiseline (npr. trikloroocetnom kiselinom, kada se dobije glikogen znatno veće molekulske mase). Svojstvo glikogena da u reakciji s jodom daje crveno – smeđe obojenje omogućava kolorimetrijsku kvantifikaciju produkata. Boja otopine ovisi o koncentraciji glikogena, temperaturi, koncentraciji joda i izvoru glikogena, te nije osobito pouzdana i reproducibilna.

Suvremene enzimatske metode su bitno pouzdanije i točnije (Miller i sur., 2000). Zasnivaju se na formuli Monin-a i Sellier-a (1985):

$$GP (\mu\text{mol/g svježeg tkiva}) = 2[(\text{glikogen}) + (\text{glukoza-6-fosfat}) + (\text{glukoza})] + \text{laktat}$$

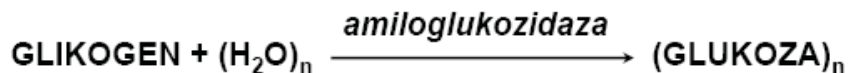
Kombinacija mjerenja glikogena i laktata omogućava izračunavanje vrijednosti GP koja je bitno manje osjetljiva na vrijeme i način uzorkovanja, nego bilo koja od ovih vrijednosti zasebno (Hartschuh i sur., 2002).

ENZIMATSKA METODA ZA MJERENJE GP-a

Određivanje GP-a vrši se na malim uzorcima mišićnog tkiva, kako nakon klanja, tako i nakon biopsije žive životinje. Uzorci tkiva se moraju zaštititi od oksidacije te mogućih onečišćenja za vrijeme rukovanja i transporta do laboratorija. Metoda koja daje pouzdane i reproducibilne rezultate je modificirana metoda po Keppler-u i Decker-u (1974), a uključuje tri faze: pripremu uzorka, određivanje koncentracije glukoze, te određivanje koncentracije laktata.

Priprema uzoraka

Mišićno tkivo uzeto za analizu mora se usitniti (homogenizirati), kako bi se u njemu mogla mjeriti koncentracija glukoze i laktata. Budući da se određuje i koncentracija glukoze sadržane u glikogenu, potrebno je prethodno potpuno razgraditi preostali mišićni glikogen, što se postiže dodatkom enzima *amiloglukozidaze*:



U optimalnim uvjetima, 1 IU amiloglukozidaze proizvede 1 mmol glukoze u 1 min. Parametri koji utječu na ovu reakciju su temperatura, pH kao i vrijeme proteklo od smrti životinje do prikupljanja uzoraka.

Temperatura i pH

Temperatura značajno utječe na postmortalnu razgradnju glukoze. Smanjenje temperature mesa za samo 1 – 2 °C uzrokuje sporiji pad pH – vrijednosti mesa, pa je stoga nužno hladiti meso odmah nakon smrti. Pri tome treba imati na umu da pojedini mišići različitom brzinom reagiraju na promjenu temperature. Tako se ledni mišić *m. longissimus dorsi* brže hladi od bedrenog mišića (*m. biceps femuris*, Wulf i sur., 2002), pa su i promjene pH vrijednosti, kao i rezultirajući GP, u tim mišićima različiti. Uzorke mišićnog tkiva potrebno je držati na ledu do analize, a ako će se analiza raditi nakon duljeg vremenskog razdoblja, potrebno ih je zamrznuti u tekućem dušiku.

pH je u mišićnom tkivu najviši neposredno nakon klanja, potom se smanjuje (uglavnom zbog razgradnje glikogena i povećanja masenog udjela laktata), da bi u razdoblju od 24h do 48h nakon smrti poprimio najniže vrijednosti. Nakon toga pH lagano raste, što je rezultat proteolitičkih procesa u mesu (Kovačević, 2001).

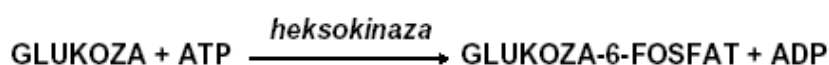
Vrijeme prikupljanja uzoraka

Znanstvenici se uglavnom slažu da vrijeme prikupljanja uzoraka nakon klanja nije presudan faktor pri određivanju PG-a, budući se pri njegovu određivanju uzimaju u obzir kako količina preostalog glikogena, tako i produkata njegove razgradnje poput glukoze, glukoza-6-fosfata, te laktata. Uzorci uzeti u različito vrijeme nakon klanja imat će podjednake vrijednosti GP-a, jer se mišićni glikogen nalazi u različitim stadijima glikolize. Uzorci uzeti 45 min. nakon klanja sadržavat će više glikogena, a manje laktata, dok će u uzorcima uzetim 24 h kasnije, odnos biti obrnut (Maribo i sur., 1999). Budući da su za izračun GP-a potrebne obje vrijednosti, konačni GP bit će isti. Hanson i Calkins (2001) su predložili da je optimalno vrijeme uzimanja uzoraka najkasnije 24 h nakon klanja.

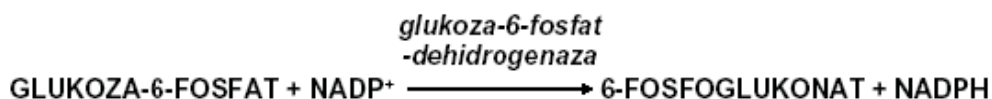
Princip određivanja glukoze

Koncentracija ukupne glukoze određuje se enzimskim reakcijama pomoću enzima *heksokinaze* i *glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze*.

U prvom koraku glukoza se fosforizira u glukozu-6-fosfat enzimom *heksokinazom*, uz ATP:



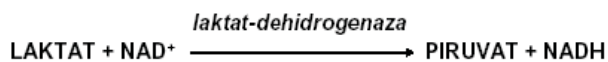
U drugom koraku glukoza-6-fosfat se oksidira u 6-fosfoglukonat enzimom *glukoza-6-fosfat-dehidrogenazom*, pri čemu se oksidoreduktivni kofaktor NADP^+ reducira u NADPH:



Količina nastalog NADPH proporcionalna je koncentraciji glukoze, a određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorpcije na 340 nm.

Princip određivanja laktata

Koncentracija laktata određuje se enzimskom reakcijom pomoću enzima *laktat-dehidrogenaze*. U reakciji se laktat oksidira u piruvat, a oksidoreduktivni kofaktor NAD^+ se reducira u NADH:



Količina nastalog NADH proporcionalna je koncentraciji laktata, a određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorpcije na 340 nm.

Optimalni uvjeti rada (pH, temperatura) enzima korištenih pri određivanju GP prikazani su na tablici 1. Tablica također sadrži popis provjerenih izvora za njihovu nabavu, s aktualnim web-adresama.

Tablica 1. Optimalni uvjeti za enzimatsko određivanje GP-a

Table 1. Optimal conditions for enzymatic GP determination

Enzim	pH	T / °C	Izvor
Amiloglukozidaza	3.6 - 4.2	60	Sigma*
Heksokinaza	7.5 - 9.0	50	<i>Sols i sur. , 1958</i> TOYOBO**
Glukoza-6-fosfat -dehidrogenaza	7.8	50 - 55	TOYOBO**
Laktat-dehidrogenaza	10.5 - 10.8	70	TOYOBO**

* Sigma - Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html>)

** TOYOBO Biochemistry Department (<http://www.toyobo.co.jp/e/seihin/xr/enzyme/index.html>)

VAŽNOST ODREĐIVANJA GP-a

Brojne su studije koje povezuju GP-a sa parametrima koji utječu na kvalitetu mesa. Među spomenutim parametrima najvažniji su količina glikogena pohranjena u mišićima u vrijeme klanja kao i intenzitet postmortalne glikolize. Oba direktno utječu na nakupljanje laktata, a posljedično tome i na svojstva koja određuju kvalitetu mesa (Bendall i Swatland, 1988). Uz umjerenu brzinu postmortalne glikolize pH opada sporije, meso ostaje crveno i zadržava sposobnost vezanja vode, tj. posjeduje poželjne osobine. Suprotno tome, pri naglom padu pH uslijed nastajanja velike količine laktata u mesu koje nije hlađeno, ono je slabe kvalitete. Vrijednosti GP-a su i genetski određene. Sorte svinja (npr. Hampshire) koje su nositelji Random Napoli (RN) gena imaju veći GP, koji iznosi više od 80, a doseže i 300 $\mu\text{mol/g}$ svježeg tkiva (Monin i Sellier, 1985; Fernandez i sur., 1992). Unatoč tome, nemaju sve sorte svinja koje su nositelji RN gena nužno i meso slabe kvalitete (van Laack i Kauffman, 1999).

U novije vrijeme sve više istraživanja usmjereno je ka mjerenju GP-a prije smrti (*ante-mortem*) kao jednog od parametra na temelju kojeg se može pretpostaviti ne samo kvaliteta mesa prije, nego i poslije klanja. Kod određivanja GP-a *in vivo*, bitno je uzorak uzet biopsijom odmah nakon vađenja isprati od krvi i zalediti u tekućem dušiku, te čuvati na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Ako rezultati biopsije pokažu visoke vrijednosti GP-a, može se pretpostaviti da će meso životinje, ukoliko se odmah usmrti, biti slabije kvalitete. U tom slučaju za mesnu industriju važno je znati što se može poduzeti u razdoblju od biopsije do klanja, kako bi se smanjio GP i u konačnici osiguralo kvalitetnije meso.

Za postizanje kvalitetnijeg mesa bitan je pravilan uzgoj životinja, u kojem su najvažniji parametri odgovarajuća prehrana i minimalna razina stresa. Način prehrane od velike je važnosti za kvalitetu mesa. Dokazano je da davanje hrane bogate ugljikohidratima neposredno prije smrti povećava razinu uskladištenog glikogena. Prije klanja životinju bi trebalo staviti na dijetu, koja podrazumijeva hranu s niskim glikemijskim indeksom. Razinu postmortalne anaerobne glikolize moguće je smanjiti dodatkom određenih aditiva u hranu koji inhibiraju glikolitičke enzime. Jedan od aditiva koji djeluje kao inhibitor enzima *laktat-dehidrogenaze* je ksantaurin. Pripada skupini flavonoida i prirodni je sastojak voća i povrća.

Stres ima znatno kompleksnije i kadkad suprotno djelovanje na GP. U većini slučajeva životinje je potrebno transportirati od uzgajališta do klaonice. Preporuka je da životinje treba što kraće i mirnije prevoziti, jer inače razina stresa znatno raste. Suprotno tome, transport prije klanja uvelike smanjuje količinu uskladištenog glikogena (Leheska i sur., 2003). Istraživanja rađena na svinjama *in vivo* pokazala su da transport životinja iste vrste u trajanju do 2 h ne uzrokuje stres (Fernandez, 1992.). Vrijeme boravka u stočnom depou ne smije biti predugo, jer svinje mogu nakon oporavka od stresa nastalog za vrijeme dugog i neugodnog transporta postati međusobno agresivne što dovodi do gubitka energije (Warriss, 2004.). Kao odgovor na stres može doći do lučenja adrenalina, što potiče glikolizu, tj. uzrokuje smanjenje koncentracije glikogena (Fernandez i sur., 2002., Jensen i sur., 1999.). Navedene negativne čimbenike potrebno je svesti na minimum, a pojačati faktore koji pozitivno utječu na proces pretvorbe mišića u meso.

ZAKLJUČAK

Enzimi *amiloglukozidaza*, *heksokinaza*, *glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza* i *laktat-dehidrogenaza* omogućavaju najpouzdanije i najtočnije određivanje GP-a kako u mišićnom tkivu žive životinje, tako i nakon njezina usmrćivanja. Poznavanje vrijednosti GP-a koristan je parametar koji omogućava predviđanje kvalitete mesa, kao i odabir mjera za poboljšanje njegove kvalitete. Iz tog razloga se može koristiti u industrijskoj proizvodnji konzumnog mesa.

LITERATURA

1. Alonso, M. D., Lomako, J., Lomako, W. M., Wehelan, W. J (1995): A new look at the biogenesis of glycogen. *The FASEB Journal*, 9: 1126-1137.
2. Bendall, J. R., Swatland, H. J. (1988): A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*, 24: 85.
3. Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L. (2007): *Biochemistry*, Sixth Edition, W. H. Freeman and Comp., New York, USA, Ch. 16 and 21.
4. Fernandez, X., Tornberg, E., Naveau, J., Talmant, A., Monin, G. (1992): Bimodal distribution of the muscle glycolytic potential in French and Swedish popu-

- lations of Hampshire crossbred pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59: 307.
5. Fernandez, X., Neyraud, E., Astruc, T., Sante, V. (2002): Effects of halothane genotype and pre-slaughter treatment on pig meat quality. Part 1. *Post mortem* metabolism, meat quality indicators and sensory traits of *m. longissimus lumborum*. *Meat Science*, 62: 429–437.
 6. Hanson, D. J., Calkins, C. R. (2001): The Effects of Post-Harvesting Time and Temperature on Glycolytic Potential of Beef Muscle. Nebraska Beef Cattle Reports. University of Nebraska, Animal Science Department
 7. Hartschuh, J. K., Novakofski, J., McKeith, F. K. (2002): Practical aspects of the glycolytic potential assay. In *Proceedings of the 55th Reciprocal Meat Conference*, pp. 39-42, American Meat Science Association, Savoy, Ill.
 8. Jensen, J., Aslesen, R., Jebens, E., Skronnal, A. (1999): Adrenaline-mediated glycogen phosphorylase activation is enhanced in rat soleus muscle with increased glycogen content. *Biochemica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1472: 215-222.
 9. Keppler, D., Decker, K. (1974): Glycogen: Determination with Amyloglucosidase. In: *Methods of enzymatic analysis*, Vol II. 3: 1127.
 10. Kovačević, D. (2001): Postmortalne promjene mesa. *Kemija i tehnologija mesa i ribe*. Sveučilište J. J. Strossmayera, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 8: 52-60.
 11. Leheska, J. M., Wulf, D. M., Jorgensen, P. F. (2003): Effect of fasting and transportation on pork quality development and extent of post-mortem metabolism. *Journal of Animal Science*, 81: 3194-3202.
 12. Maribo, H., Strier, S., Jorgensen, P. F. (1999): Procedure for determination of glycolytic potential in porcine *M. longissimus dorsi*. *Meat Science*, 51: 191–193.
 13. Mayes, P. A., Bender, D. A. (2003): *Glycolysis & the Oxidation of Pyruvate*. Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, McGraw-Hill Companies, Inc., USA, 17: 136-144.
 14. Monin, G., Sellier, P. (1985): Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate postmortem period, the case of the Hampshire breed. *Meat Science* 13: 49-63.
 15. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005): *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th edn., W.H. Freeman and Company, New York, USA.
 16. Roach, P. J. (2002): Glycogen and its metabolism. *Current Molecular Medicine*, 2: 101-120.
 17. Van Laack, R. L. J. M., Kauffman, R. G. (1999): Glycolytic potential of red, soft exudative pork longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 77: 2971-2973.
 18. Warriss, P. D., Brown, S. N., Lopez-Bote, C, Bevis E. A., Adams, S. J. M. (1989) : Evaluation of lean meat quality in pigs using two electronic probes. *Meat Science*, 25: 281–291.
 19. Wulf, D. M., Emnett, R. S., Leheska, J. M., Moeller S. J. (2002): Relationship among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm and dry) beef, and cooked beef palatability. *Journal of Animal Science* 80: 1895-1903.

SUMMARY

Muscle to meat conversion is a complex biochemical process, depending on various parameters. The understanding of biochemical changes occurring *ante-mortem* and *post-mortem* in muscle tissue is necessary for production of high quality meat, attractive to potential customers. The term glycolytic potential defines the potential of individual muscle to form lactate. A large amount of lactate generated in the short time causes a rapid fall of meat pH, and formation of poor quality meat. Lactate and glycogen (potential source of additional lactate) in muscle tissue can be precisely determined by enzymatic methods. In this article a concise description of enzymatic assay for glycolytic potential determination is presented.

Key words: glycolytic potential, meat quality, glucose, lactate