

Obsah hemových barviv ve sva- lech různých živočišných druhů a metody jejich analýzy

Ing. Petr Coufal

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Ústav konzervace potravin a technologie masa.

S rostoucími nároky na kvalitu produkce masných závodů jsou kladeny stále vyšší požadavky na výzkum a studium v oblasti technologie masa. Jedním z témat, které svou podstatou přesahuje rámce tradiční technologie, ale významně ovlivňuje kvalitu masa, je problematika hemových barviv a skutečností s ní související.

Úvod

Obsah hemových barviv má přímý vliv na barvu masa a proto je považován za důležitý kvalitativní faktor. Vedle rozhodujícího podílu svalového barviva myoglobinu, se na barvě masa nezanedbatelnou měrou podílí i krevní barvivo myoglobin, jehož obsah a výskyt je u masa podmíněn stupněm vykrvení. I když jsou odpovědi na otázky po stupni vykrvení často rozporné, převažuje požadavek dosažení co nejvyššího stupně vykrvení a tedy nejnižšího obsahu hemoglobinu.

Vzhledem k výše zmíněným okolnostem jsou snahy sledovat obsah hemových barviv v závislosti na různých vlivech. Na prvním místě jsou to vlivy stáří, pohlaví, výživy a samozřejmě vliv živočišného druhu. V neposlední řadě mají na obsah hemových barviv významný vliv některé intravitální vlivy. Například předporážkové ošetření, přihánění na porážku, ale i některé operace jatečného opracování tedy omračování a vykrvení.

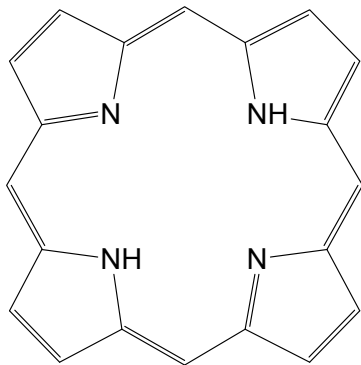
Aby bylo možné veškeré vlivy kvantifikovat a porovnávat je důležitou otázkou reprodukovatelná a dostatečně přesná analytika hemových barviv. Význam má zejména izolace a současné stanovení obou hemových barviv se zaměřením na obsah hemoglobinu, který vyjadřuje stupeň vykrvení jatečného kusu. Vedle méně přesných absorpčních měření barvy eventuálně separace na gelu se dnes prosazuje použití přesných preparativních metod, z nichž je v této souvislosti uváděna zejména elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.

Teoretická část

Barva masa a hemová barviva

Červená barva masa je způsobena selektivní absorpcí modrozelených paprsků bílého světla barvivem masa. Odražené paprsky vyvolávají v lidském oku vjem červené barvy. Za tuto skutečnost jsou zodpo-

Obrázek 1. Molekula porfirinu.



vědné speciální chemické sloučeniny (hemové pigmenty), které jsou lokalizovány ve svalovém plazmatu, v kapilární krvi a některých respiračních enzymech [2].

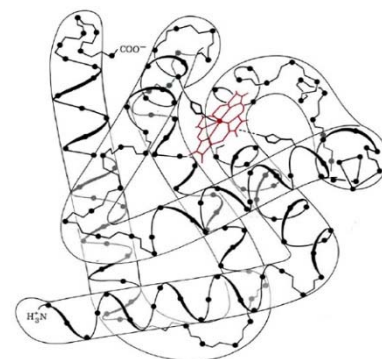
Hemová barviva jsou typickými zástupci tzv. sarkoplazmatických bílkovin. Jsou charakteristické obsahem železa ve formě pevného organického komplexu, jež může existovat i po hydro-

lyze apoproteinové složky. Dělíme je podle jejich chemické struktury, jejich funkce a umístění. Svalové barvivo myoglobin a krevní barvivo hemoglobin. Jsou původcem červené barvy masa resp. krve a patří chemicky do skupiny tzv. chromoproteinů [3]. Komplexotvornou složku hemu tvoří porfyriny. Jsou to deriváty chemicky odvozené od základního makrocyclu porfirinu (viz **Obrázek 1**) [4].

Myoglobin – svalové barvivo

Myoglobin je vlastní svalové barvivo, které slouží jako zásobárna kyslíku ve sva-
lech. Jde o monomerní bílkovinnou molekulu složenou ze 153 zbytků aminokysel-

lin. Celá molekula pak sestává z osmi úseků uspořádaných do α šroubovic, sbalených do kompaktní globule. Jako prostetická skupina figuruje hem, což je ferroporphyrin IX s pentakoordinovaným atomem železa. Za pomoci prvních čtyř ligandů se vytváří charakteristická kruhová struktura se čtyřmi pyrolovými jádry, jako pátý ligand slouží dusíkový atom histidinu (napojení globulinu) a šestý ligand je volný a je původcem reaktivity myoglobinu [3-5].



Obrázek 2. Struktura myoglobinu [1].

Hemoglobin – krevní barvivo

Hemoglobin je vlastní krevní barvivo zprostředkující přenos kyslíku z plic do svalu a podílí se na odvádění oxidu uhličitého ze svalu. Chemicky se jedná o tetramer skládající se ze čtyř podjednotek, jež jsou strukturně podobné myoglobinu. S existencí těchto podjednotek je spojena přibližně čtyřnásobná molekulová hmotnost oproti myoglobinu a odtud i vyšší vazebná účinnost ke kyslíku [6; 7].

Rozdílné molekulové hmotnosti hemových pigmentů jsou základem jejich analytické identifikace a izolace a kromě toho mohou být základem určení zbytkové (tzv. reziduální) krve v mase jatečně opracovaného zvířete [8-11].

Faktory ovlivňující obsah hemových barviv

Mezi faktory mající značný vliv na obsah hemových barviv dominují především intravitální vlivy, tedy vlivy působící ještě za života zvířete. Patří sem především živočišný druh (viz **Tabulka 1**), plemeno, pohlaví, věk, ranost, kastrace, výživa, nemoci, únava nebo hladovění.

Svalovina	Obsah hemových barviv (mg/kg)
Kuřecí	126
Krůtí	125 – 456
Králíčí	200
Telecí	438
Vepřová	254 – 1527
Kachní	1168
Husí	1568
Hovězí	1710 – 5000
Jehněčí	2500
Koňské	3620 – 8000
Velrybí	9100

Tabulka 1. Obsah hemových barviv v závislosti na živočišném druhu.

Vedle toho mají na barvu masa významný vliv i některé operace jatečného zpracování. Jedná se především o přihon a vykrvování. Zde je zajímavé obrátit pozornost také na negativní vliv přepravy, předporážkového ustájení ev. nevhodně provedeného omračování. Výsledkem může být stres, který má jednoznačně prokazatelný vliv na kvalitu masa vlivem projevení některých patofyziologických změn. Dané změny se mohou přímo i nepřímou podílet na změně barvy masa a tedy i obsahu hemových barviv.

Význam těchto operací je zesilován bezprostředním vlivem na obsah hemových barviv v jatečně opracovaném těle a také proto, že důkladná znalost jednotlivých operací a zejména jejich pozitivní ovlivnění, může znamenat výrazné zvýšení kvality masa.

Praktická část

Analytika hemových barviv

Základním východiskem pro stanovení obsahu hemových barviv, ať již celkových nebo jejich separace a současné stanovení, je barva, která je základem tradičního spektrofotometrického absorpčního stanovení veškerých hemových barviv.

Významnou skutečností je však také velikost a tvar molekul hemových barviv. Na tomto základě je možno užít například gelové filtrace na sephadexovém gelu, při které dochází k odseparování jednotlivých hemových barviv na základě rozdílné retardace látky v gelu.

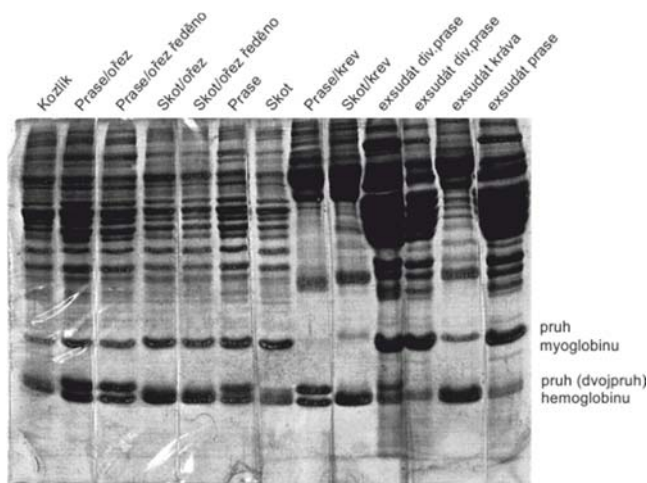
Různé variace kapalinové chromatografie se zařazenými ionexovými ev. gelovými kolonami, jsou založeny na rozdílných nábojových vlastnostech hemových pigmentů a tudíž rozdílné retenci k použitému ionexovému materiálu. Zde je možné se setkat i s kombinací obou separačních principů, kdy je ionexový materiál „zakotven“ na gelovém nosiči.

Nejpoužívanější technikou pro hemová barviva a svalové bílkoviny je elektroforéza v gelózním prostředí. Dochází tak k separaci látek na principu síťového efektu, na základě rozdílu v náboji resp. rozdílné elektroforetické pohyblivosti, popř. na základě rozdílných izoelektrických bodů jednotlivých hemových proteinů.

Elektroforetické (elektromigrační) metody

Náhodný pohyb anorganických částic v koloidním roztoku pod vlivem elektrického pole, je znám již od roku 1892. Brzy poté se zjistilo, že podobně se ve vodném roztoku chovají proteiny. Za sestavení první elektroforetické aparatury dostal v roce 1948 Nobelovu cenu za chemii švédský vědec Arne W. Tiselius. Podařilo se mu rozdělit proteiny krevního séra na základě jejich elektroforetických mobilít. V nepříliš odlišném uspořádání se elektroforéza proteinů krevního séra jako diagnostická metoda dodnes používá na mnoha klinikách.

V minulosti byla vypracována řada elektroforetických metod, které se vzájemně liší způsobem práce i principem, na kterém je separace založena. Lze je provádět buď ve vodných roztocích pufrů, nebo na nosičích. V současnosti se pro vyšší přesnost a lepší reprodukovatelnost používá elektroforéza na nosičích. Nejčastěji používaný materiál je polyakrylamidový gel, který umožňuje nejen stabilizovat a nést molekuly bílkovin, ale současně ovlivňuje separaci tím, že působí jako molekulové síto [12]. Polyakrylamidový gel má oproti jiným gelům výhodu, že má vyšší podíl křížových vazeb, a tedy i vyšší síťový efekt.



Obrázek 3. Gelový elektroforeogram se separovanými barvivy.

Elektroforéza SDS-PAAG

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAAG) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) využívá principů a výhod gelové elektroforézy ve spojení aniontovým detergentem. SDS nese poměrně vysoký náboj a proto ve vazbě na bílkovinu ekvilibruje nábojové rozdíly bíl-

kovin a ty se v gelu pohybují jen podle rozdílu ve své velikosti. Výsledné komplexy SDS-bílkovina pak mají stejnou hustotu povrchového náboje a zároveň se jejich konformace do té míry unifikuje, že relativní molekulová hmotnosti bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS [12; 13].

Závěr

Jestliže se provede SDS-PAAG elektroforéza s vhodně získaným svalovým extraktem je dosaženo relativně dobrého rozdělení bílkovin. Zajímavou skutečností, která souvisí s nízkou molekulovou hmotností myoglobinu a hemoglobinu je, že na konci obarveného PAAG jsou zřetelné pruhy právě hemoglobinu a myoglobinu. Tato výhodná pozice, vzhledem k ostatním proteinům, je využívána k identifikaci živočišných druhů a je vhodná i pro nerušené denzitometrické vyhodnocení v souvislosti s analýzou hemových barviv. Diskontinuální SDS PAAG elektroforéza je tedy vhodná jak pro současné stanovení obou hemových pigmentů, tak i pro vyšetření stupně vykrvení u jatečně opracovaných těl [6; 7].

V souvislosti s analýzou mas různých živočišných druhů, resp. jejich opětovným zamrazováním a rozmrazováním došlo u řady vzorků k produkci masové šťávy, kterou označujeme jako exsudát. Tato skutečnost je důsledkem fyzikálně-chemických procesů, jež provází tvorbu ledových krystalů uvnitř svaloviny a jejich opětovný zánik. I když je možné tento velmi nežádoucí jev vhodným způsobem ovlivnit (rychlé šokové zmrazování, pozvolné rozmrazování), byla zjištěna při proměření exsudátů SDS-PAAG elektroforézou vysoká přítomnost jak hemoglobinu, tak i svalového barviva myoglobinu. Vizualním posouzením gelů je možno konstatovat i přítomnost svalových bílkovin.

Použitá literatura

1. MOORE, J., DAVIES, G., COLLINS, R. Chemistry. In STRUCTURE OF MYOGLOBIN.JPG. McGraw-Hill Companies, 1978, sv. 141 kB.
2. ZATOČIL, G., GILKA, J. Barva masa a masných výrobků. Edtion ed., 1964.
3. PIPEK, P. Technologie masa I. edited by 2. Edtion ed., 1991.
4. ŠÍPAL, Z. Biochemie. Edtion ed., 1992.
5. BELICA, J. Fleischwirtschaft, 1981, s. 1290.
6. HOFMANN, K., BLÜCHEL, E. Mitteilungsblatt, 1992, sv. 31, s. 230.
7. WARRISS, P. D. Meat Science, 1978, sv. 2, s. 155.
8. BAUER, F., HOFMANN, K. Fleischwirtschaft, 1987, sv. 67, s. 861.
9. HOFMANN, K. Fleischwirtschaft, 1986, sv. 66, s. 91.
10. HOFMANN, K., B., E. Fleischwirtschaft, 1992, sv. 72, s. 85.
11. STOLLE, A., PAULICK, CH. Fleischwirtschaft, 1990, sv. 70, s. 274.
12. KRÁLOVÁ, B., KÁŠ, J., RAUCH, P. Laboratoř z biochemie Edtion ed., 1990.
13. KRÁLOVÁ, B., MAREK, M. Izolace a stabilizace enzymů. Edtion ed., 1988.