

Dominika Guzek¹, Krzysztof Głabski², Dominika Głabska³,
Grzegorz Pogorzelski¹, Jerzy Barszczewski⁴, Agnieszka Wierzbicka¹

ZASTOSOWANIE TECHNIKI MIKROSKOPOWEJ DO OCENY STRUKTURY MIĘSA WOŁOWEGO PRZEZ POMIAR DŁUGOŚCI SARKOMERÓW

Streszczenie. Celem pracy była ocena stopnia zróżnicowania długości sarkomerów mięśnia podgrzebieniowego z mięsa wołowego bydła rasy Limousin przy zastosowaniu techniki mikroskopowej. Przygotowano preparat mikroskopowy z próby mięśnia podgrzebieniowego (*Infraspinatus*) i dokonano jego oceny przy wykorzystaniu mikroskopu w kontraście Nomarskiego. Następnie dokonano pomiaru długości sarkomerów należących do trzech różnych, reprezentatywnych miofibryli. Długości sarkomerów należących do różnych miofibryli stanowiły wartości charakteryzujące się rozkładem normalnym. Średnia długość sarkomeru, w zależności od miofibryli wynosiła od $2,18 \pm 0,11 \mu\text{m}$ do $2,55 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Równocześnie stwierdzono, że różnice długości sarkomerów były zależne od miofibryli i dla porównania każdych dwóch analizowanych miofibryli, różniły się w sposób istotny statystycznie ($p=0,0244$; $p=0,0000$; $p=0,0000$). Przeprowadzone analizy pozwalają na wnioskowanie, że długości sarkomerów w obrębie mięśnia mogą różnić się znacznie i jest to zależne od tego z jakiej miofibryli pochodzą. Dlatego niezmiernie ważne jest zastosowanie techniki pozwalającej na ocenę wyizolowanych pojedynczych miofibryli i porównanie ich między sobą.

Słowa kluczowe: sarkomery, miofibryle, mięso wołowe, mikroskop

WSTĘP

Zróżnicowanie kruchości mięsa wołowego jest jednym z ważniejszych problemów w produkcji wołowiny Polsce i na świecie [11], gdyż warunkuje satysfakcję konsumentów i wpływa na decyzję o zakupie mięsa [8, 10]. W badaniach wskazuje się na wpływ długości sarkomerów na właściwości fizyczne mięsa, w tym między innymi na wartość współczynnika twardości, która odzwierciedla zależność jaka występuje między długością sarkomerów a stopniem proteolizy *post mortem* [3].

W stanie spoczynku długość sarkomeru wynosi około $2,5 \mu\text{m}$, podczas gdy w trakcie skurczu, w tym skurczu chłodniczego, może wynosić zaledwie 30% początkowej wartości [1].

¹ Zakład Techniki w Żywnieniu, Wydział Nauk o Żywnieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, e-mail: dominika_guzek@sggw.pl

² Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, e-mail: k_glab-ski@ibb.waw.pl

³ Zakład Dietetyki, Wydział Nauk o Żywnieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, e-mail: k_glab-ski@ibb.waw.pl

⁴ Zakład Użytków Zielonych, Instytut Technologiczno-Przyrodniczy w Falentach, e-mail: j.Barszczewski@itep.edu.pl

Przyjmuje się, że sarkomery o długości poniżej 2 μm przyczyniają się do większej twardości mięsa podczas, gdy te powyżej 2 μm – do mniejszej. Jednakże, nie wyjaśniają one w pełni twardości i tak na przykład w przypadku mięśnia półścięgniastego (*Semiteninosus*), ich długość eksplikuje jedynie 16% tej cechy, a dla mięśnia najdłuższego grzbietu (*Longissimus dorsi*) – 46% [13]. W niektórych baniach nie stwierdza się w ogóle korelacji między długością sarkomerów a twardością mięsa wołowego [12], a wskazuje się na kilka czynników łącznie wpływających na ten parametr tj., zawartości kolagenu, długości sarkomerów i degradacji desminy [6, 13], grubości omięsnej, średnicy włókien i miofibryli [4]. Złożoność tego zjawiska wymaga dogłębnej analizy mikroskopowej struktury mięsa. Celem pracy była analiza możliwości oceny struktury mięsa wołowego przez pomiar długości sarkomerów przy zastosowaniu techniki mikroskopowej.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał badawczy stanowiły próby mięsa wołowego pochodzącego z buhaja rasy Limousin o masie 466,4kg (wagi bitej ciepłej), konformacji U i klasie odtuszczenia 3 uzyskane z badań w ramach Programu realizowanego w Instytucie Technologiczno-Przyrodniczym w Falentach pt. „Ulepszanie krajowych źródeł białka roślinnego, ich produkcji, systemu obrotu i wykorzystania w paszach”. Z odpowiednio pobranej próby mięśnia podgrzebieniowego (5 g) przygotowano preparat w roztworze sacharozы, w którym dzięki przeprowadzonej homogenizacji (5000 rpm, 60 sekund), wyizolowano pojedyncze miofibryle. Przy ocenie wykorzystano mikroskop Carl Zeiss Axio Imager.M2 z obiektywem EC Plan-Neofluar 100x/1.30 Oil Ph 3 M27 oraz kamerą AxioCamMR5. Obserwacje wykonywano w kontraście Nomarskiego (DIC – ang. *differentia interference contrast*).

Po homogenizacji, miofibryle widoczne były w preparacie mikroskopowym jako wyizolowane struktury (przykładowe miofibryle zaprezentowano na zdjęciu na rysunku 1a i rysunku 1c lub połączone po dwa (przykładowe miofibryle zaprezentowano na zdjęciu na rysunku 1b). Jednakże, w celu większej dokładności pomiaru do dalszej analizy włączono wyłącznie te miofibryle, które wyizolowano całkowicie jako pojedyncze struktury. Pobrano łącznie 15 zdjęć z losowo wybranych obszarów przygotowanego preparatu, a z nich losowo wybrano 3, na których widoczne były pojedyncze i nienaruszone miofibryle. Przy wykorzystaniu programu AxioVision Rel.4.8.2 (Carl Zeiss). Dokonano pomiaru długości sarkomerów w obrębie analizowanych miofibryli, przy czym dla każdej z miofibryli zmierzono przynajmniej 25 sarkomerów.

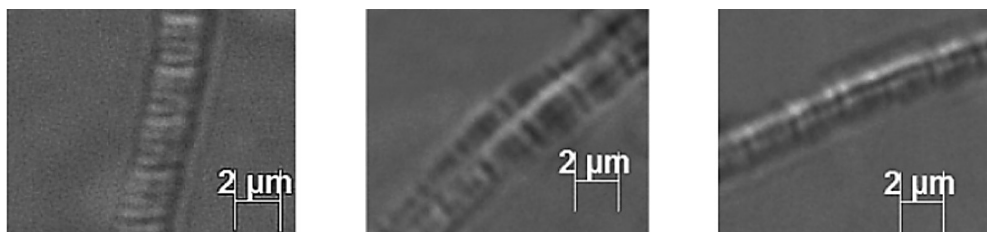
Przy przeprowadzeniu analizy statystycznej dla oceny normalności rozkładu wykorzystano test Shapiro-Wilka. Przy porównaniu rozkładów wykorzystano test t-Studenta (Hypothesis Test). Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica 8,0 (StatSoft, Inc.). Przy określaniu istotności różnic przyjęto poziom istotności $\alpha \leq 0,05$, a poziom $\alpha \leq 0,1$ przyjęto jako bliski istotności statystycznej.

WYNIKI I DISKUSJA

W obrębie porównywanych grup sarkomerów dla różnych miofibryli (rys. 1) stwierdzono dość duże zróżnicowanie w długości poszczególnych sarkomerów, różnice się sięgały 0,48 μm dla miofibryli nr 1, co stanowiło około 20% średniej ich długości. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi spostrzeżeniami badaczy, którzy stwierdzają, iż w poszczególnych miofibrylach można zaobserwować, iż sąsiadujące sarkomery mogą znacznie różnić się pod względem ich długości [9].

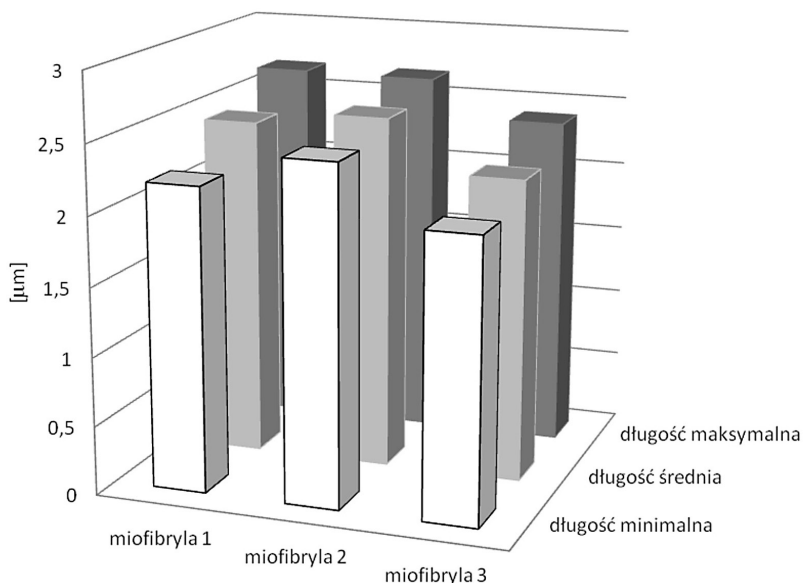
Mimo znacznego zróżnicowania, stwierdzono, że rozkład wyników dla poszczególnych miofibryli był normalny, co wskazywać może, że obserwowane różnice stanowiły wyraz naturalnej zmienności obserwowanej w materiale biologicznym. W prowadzonych badaniach nad długościami sarkomerów w mięśniach generalnie stwierdza się, że zarówno średnica włókna, jak i sama długość sarkomerów może być różna w zależności od rodzaju mięśnia, z którego pochodzi [7]. Ponadto, długość sarkomerów może być istotnie różna nawet dla tego samego rodzaju mięśnia pochodzącego z tej samej sztuki bydła, której półtusze były inaczej podwieszane po uboju (podwieszanie za ścięgno Achillesa lub za miednicę) [2].

W przedstawionej ocenie długości sarkomerów (tab. 1) stwierdzono istotne statystycznie różnice poszczególnych miofibryli. Tym samym należy stwierdzić, że długości sarkomerów były zależne od ocenianej miofibryli. Długość poszczególnych sarkomerów wynosiła przeciętnie powyżej 2 μm , co, jak wskazują wcześniejsze badania [13] sugeruje, że badane mięso było miękkie. Jednakże na te mechaniczne właściwości mięśnia, na co wskazują wyniki Lepetit [5] ma wpływ nie tylko sama długość sarkomerów we włóknach mięśniowych, ale także zmiany właściwości mechanicznych włókien kolagenowych, dlatego one same nie mogą służyć jako wyznacznik kruchości mięsa wołowego. Z badań nad mięsem wołowym wynika również, że długość sarkomerów wyjaśnia jedynie 16% zmienności kruchości w przypadku mięśnia półścięgnistego i 46% w przypadku mięśnia najdłuższego grzbietu [13]. Podsumowując, ocena mikroskopowa struktury mięsa wołowego, przy za-



Rys. 1. Przykładowe obrazy fragmentów miofibryli z widocznymi sarkomerami obserwowanymi w preparatach mikroskopowych

Fig. 1. Examples of images of parts of miofibrils with visible sarcomeres observed in microscope



Rys. 2. Długości sarkomerów, zmierzone dla poszczególnych miofibryli (μm)
Fig. 2. Sarcomeres length, measured for each miofibrils (μm)

chowaniu odpowiedniej ilości powtórzeń, może posłużyć jako narzędzie wyjaśniające, w pewnym stopniu, zmienność kruchości w mięsie wołowym a przy włączeniu innych cech strukturalnych ocenianych mikroskopowo może przyczynić się również do wyjaśnienia w pełniejszym stopniu tego zjawiska.

WNIOSKI

Tabela 1. Ocena różnic długości sarkomerów zmierzonych dla poszczególnych miofibryli
Table 1. Assessment of differences between sarcomeres length measured for each miofibrils

Parametr	Miofibryla 1 (μm)	Miofibryla 2 (μm)	Miofibryla 3 (μm)
Średnia ± SD	2,45 ± 0,15	2,55 ± 0,08	2,18 ± 0,11
Mediana	2,53	2,55	2,18
Minimum	2,20	2,44	2,03
Maksimum	2,68	2,67	2,40
Rozkład	normalny	normalny	normalny
Ocena istotności różnic między poszczególnymi miofibrylami			
1 vs 2 – p = 0,0244*	←	→	
2 vs 3 – p = 0,0000*		←	→
1 vs 3 – p = 0,0000*	←		→

Analiza wyników pozwoliła wyciągnąć następujące wnioski:

1. Długości sarkomerów w obrębie mięśnia mogą różnić się znacznie a to zależne jest od tego z jakiej miofibryli pochodzą.
2. Dla właściwej oceny długości sarkomerów należy przeprowadzić ją w powtarzalnych warunkach dla przynajmniej kilku miofibryli.
3. Dla analizy długości sarkomerów szczególnie użyteczne są techniki pozwalające na ocenę wyizolowanych pojedynczych miofibryli i porównanie ich między sobą.

BIBLIOGRAFIA

1. Au Y.: The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61(24). 2004: 3016-3033.
2. England E.M., Fisher K.D., Wells S.J., Mohrhauser D.A., Gerrard D.E., Weaver A.D.: Postmortem titin proteolysis is influenced by sarcomere length in bovine muscle. *Journal of Animal Science*, vol. 90(3). 2012: 989-995.
3. Jiang S.T.: Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. *Proceedings of the National Science Council, ROC Part B. Life Science*, vol. 22. 1998: 97-107.
4. Kellermeier J.D., Tittor A.W., Brooks J.C., Galyean M.L., Yates D.A., Hutcheson J.P., Nichols W.T., Streeter M.N., Johnson B.J., Miller M.F.: Effects of zilpaterol hydrochloride with or without an estrogen-trenbolone acetate terminal implant on carcass traits, retail cutout, tenderness, and muscle fiber diameter in finishing steers. *Journal of Animal Science*, vol. 87. 2009: 3702-3711.
5. Lepetit J.: Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, vol. 80. 2008: 960-967.
6. Li C.B., Xu X.L., Zhou G.H., Xu S.Q., Zhang J.B.: Effects of carcass maturity on meat quality characteristics of beef semitendinosus muscle for chinese native yellow steers. *Animal*, vol. 1. 2007: 780-786.
7. Li Ch., Zhou G., Xu X., Zhang J., Xu S., Ji Y.: Effects of Marbling on Meat Quality Characteristics and Intramuscular Connective Tissue of Beef *Longissimus* Muscle. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 19(12). 2006: 1799-1808.
8. Lusk J.L., Fox J.A., Schroeder T.C., Mintert J., Koohmaraie M.: In-store valuation of steak tenderness. *American Journal of Agricultural Economics*, vol. 83. 2001: 539-550.
9. Ringkob T.P., Swartz D.R., Greaser M.L.: beef, chicken, and rabbit myofibrils Light microscopy and image analysis of thin filament lengths utilizing dual probes on beef, chicken, and rabbit myofibrils. *Journal of Animal Science*, vol. 82. 2004: 1445-1453.
10. Shackelford S.D., Wheeler T.L., Meade M.K., Reagan J.O., Byrnes B.L., Koohmaraie M.: Consumer impressions of Tender Select beef. *Journal of Animal Science*, vol. 79. 2001: 2605-2614.
11. Weaver A.D., Bowker B.C., Gerrard D.E.: Sarcomere length influences postmortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. *Journal of Animal Science*, vol. 86. 2008: 1925-1932.
12. Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M.: Technical note: Sampling methodology for relating sarcomere length, collagen concentration, and the extent of postmortem

- proteolysis to beef and pork longissimus tenderness. Journal of Animal Science, vol. 80. 2002: 982-987.
13. Wheeler T.L., Schackelford S.D., Koohmaraie M.: Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content and tenderness among pork muscles. Journal of Animal Science, vol. 78. 2000: 958-965.

Badania zostały wykonane w ramach Programu „Ulepszanie krajowych źródeł białka roślinnego, ich produkcji, systemu obrotu i wykorzystania w paszach” Program Wieloletni na lata 2011-2015; Produkcja wysokiej jakości pasz z trwałych użytków zielonych”.

APPLICATION OF MICROSCOPIC TECHNIQUE TO ASSESS THE STRUCTURE OF BEEF BY MEASUREMENT OF THE LENGTH OF SARCOMERES

Abstract

The aim of the presented research was to assess the sarcomere length variation in *Infraspinatus* muscle from meat of Limousin breed. Microscopic slide was prepared from the sample of muscle (*Infraspinatus*) and was evaluated in Nomarski contrast. Subsequently, sarcomeres length of three different, representative myofibrils were measured. Values of sarcomere length of myofibrils were characterized by a normal distribution. The average length of sarcomere, depending on the myofibrile, varied from $2.18 \pm 0.11 \mu\text{m}$ to $2.55 \pm 0.08 \mu\text{m}$. At the same time, it was stated that differences in sarcomere length were dependent on the myofibrile and when compared any two myofibrils, statistically significant differences were found ($p=0.0244$, $p=0.0000$, $p=0.0000$). This research allows to conclude that the length of sarcomeres within the muscle may vary and its length is dependent on myofibrile. Therefore, to measure sarcomeres, it is very important to use a technique that allows to evaluate isolated single myofibrils and compare them.

Key words: sarcomeres, myofibrils, beef meat, microscope.