

## Hidastaako glykogeenidebranching-entsyymi lihasten teurastuksen jälkeistä pH-arvon laskua?

Maria Ylä-Ajos<sup>1)</sup>, Marita Ruusunen<sup>1)</sup> ja Eero Puolanne<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Helsingin yliopisto, elintarviketeknologian laitos, Agnes Sjöbergin katu 2, PL 66, 00014 Helsingin Yliopisto, Maria.Yla-Ajos@Helsinki.fi

### Tiivistelmä

Teurastuksen jälkeen lihakset tuottavat energiaa pääasiassa anaerobisella glykolyysillä eli pilkkomalla glykogeenia useiden välivaiheiden kautta laktaatiksi. Laktaatin kertymiseen johtavan reaktiosarjan seurauksena solun pH-arvo laskee. Sekä pH-arvon laskunopeudella että saavutettavalla loppu-pH-arvolla on suuri vaikutus lihan laatuun, mm. väriin ja vedensidontakykyyn.

Lihasten väliset erot glykolyysin nopeudessa johtuvat pääosin niiden erilaisesta energiametaboliasta. Lihakset voidaan ryhmitellä vaaleisiin nopeasti supistuviin glykolyyttisiin lihaksiin ja tummiin hitaasti supistuviin oksidatiivisiin lihaksiin. Stressitilanteessa vaaleat lihakset tuottavat energiaa herkemmin anaerobisella glykolyysillä tummien lihasten pyrkimässä ylläpitämään toimintaansa aerobisesti.

Glykogeenimolekyyli rakentuu proteiiniyttimeen kiinnittyneistä, haaroittuneista glukoosiketjuista. Sen täydelliseen pilkkomiseen tarvitaan kahden entsyymin, glykogeenidebranching-entsyymin (GDE) ja glykogeenifosforylaasin, yhteistoimintaa. Fosforylaasin tiedetään toimivan erittäin nopeasti, mutta GDE:n toimintaa ei ole lihantuotantoeläimillä juurikaan tutkittu. GDEllä saattaa olla merkittävä rooli energiavirtojen säätelyssä stressitilanteessa ja teurastuksen jälkeen. Matala GDE:n aktiivisuus voi hidastaa glykogeenin pilkkoutumista lihaksissa teurastuksen jälkeinen.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin miten lämpötila ja pH-arvo vaikuttavat sian tumman poskilihakseen (*M. masseter*) ja vaalean ulkofileen (*M. longissimus dorsi*) GDE aktiivisuuteen.

Jäähdytyksen aikana lihan lämpötila laskee 42 °C:sta neljään asteeseen. GDE:n aktiivisuus lihaksissa oli korkein heti teurastuksen jälkeen esiintyvissä lämpötiloissa (39 °C ja 42 °C) ja laski merkittävästi ( $p < 0,001$ ) lämpötilan laskiessa ruhoissa jäähdytyksen aikana esiintyviin lämpötiloihin (4 °C ja 15 °C). Lämpötilan laskettua alle 15 asteen, GDE oli käytännössä inaktiivinen. Toisaalta pH-arvolla oli vain vähäinen vaikutus GDE:n aktiivisuuteen pH-välillä 7,2 (elävä lihas) - 5,6.

On havaittu, että teurastuksen jälkeinen pH-arvon lasku usein pysähtyy ennen kuin kaikki lihaksen glykogeeni on pilkkoutunut. Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että ruhon lämpötilan laskun aiheuttama GDE:n toiminnan hidastuminen saattaa olla eräs pH-arvon laskun pysäyttävistä tekijöistä. Toisaalta GDE:n toiminnan riippumattomuus pH-arvosta mahdollistaa nopean glykolyysin ja pH-arvon laskun heti teurastuksen jälkeen ruhon lämpötilan ollessa vielä korkea. Edellä mainitut olosuhteet saattavat johtaa PSE lihaisuuteen. GDE ei siis estä PSE lihan syntymistä, sillä entsyymi toimii maksimaalisella nopeudella lämpötilan ollessa korkea ja pH-arvon matala. PSE lihaisuutta voidaan kuitenkin ehkäistä nopealla jäähdytyksellä, joka laskee myös GDE:n aktiivisuutta.

Ennako-odotusten mukaisesti kummankin glykogeenia pilkkovan entsyymin, GDE:n ja fosforylaasin, aktiivisuudet olivat korkeammat vaaleassa glykolyyttisessä kuin tummassa oksidatiivisessa lihaksessa. GDE saattaa hidastaa glykogeenin pilkkoutumisen nopeutta alhaisissa lämpötiloissa tilanteessa, jossa lihasten glykogeenivarastot ovat alentuneet jo ennen teurastusta. Tämän seurauksena pH-arvon lasku hidastuu ja loppu-pH-arvo saattaa jäädä korkeammaksi, millä on vaikutusta lihan laatuun.

## Johdanto

Lihaksiin varastoitunut glykogeeni on nopeasti saatavilla oleva energianlähde supistuvassa lihaksessa. Teurastuksen jälkeen, lihasten muuttuessa biokemiallisten prosessien tuloksena lihaksi, glykogeeni on solujen tärkein energianlähde. Glykogeenin hajoaminen tapahtuu pääasiassa anaerobisesti, sillä teurastuksen jälkeen happi loppuu lihaksista nopeasti. Anaerobinen glykolyysi johtaa lihan pH-arvon laskuun. Sekä pH:n laskunopeus että saavutettava loppu-pH-arvo vaikuttavat useisiin lihan laatuominaisuuksiin, kuten väriin ja vedensidontakykyyn. Liian nopea pH-arvon lasku heti tainnutuksen jälkeen saattaa aiheuttaa lihaan pahan laatuvirheen, vaalean, pehmeän ja vetisen eli PSE-lihan muodostumisen.

Glykolyysin nopeus vaihtelee huomattavasti eri lihaksissa, johtuen pääasiassa eroista niiden energiametaboliassa. Lihakset voidaan jakaa kolmeen ryhmään mm. glykolyyttisen kapasiteetin ja supistumisnopeuden perusteella: vaaleat nopeasti supistuvat glykolyyttiset lihakset, tummat hitaasti supistuvat oksidatiiviset lihakset sekä välimuotoiset lihakset. Vaaleiden lihasten lihassolut sisältävät enemmän glykogeenia ja glykolyyttisiä entsyymejä, ovat kooltaan suurempia, mutta niiden verenkierto ja siten hapensaanti on heikompi kuin tummissa lihaksissa. Stressitilanteessa vaaleat lihakset tuottavat energiaa herkemmin anaerobisella glykolyysillä tummien lihasten pyrkiessä ylläpitämään toimintaansa aerobisesti. Myös teurastuksen jälkeen vaaleiden lihasten glykolyysi on nopeampi ja niiden loppu-pH-arvo on usein matalampi kuin tummissa lihaksissa.

Glykogeenimolekyylit koostuu proteiiniyttimeen liittyneistä haaroittuneista glukoosiketjuista (Gunja-Smith ym., 1970; Goldsmith ym., 1982; Lomako ym., 2004). Glukoosiketjut ovat järjestäytyneet siten, että ne antavat molekyylille kerroksittaisen rakenteen. Uloimman kerroksen glukoosiketjut ovat haaroittumattomia ja sisältävät puolet koko molekyyliin varastoituneesta glukoosista (Goldsmith ym., 1982). Toisin sanoen kun glykogeenimolekyylit pilkotaan kerros kerrokselta, jokaisessa kerroksessa on vain puolet sitä edeltävän kerroksen glukoosimäärästä. Glykogeenin täydellinen pilkkominen vaatii kahden entsyymin yhteistoimintaa. Glykogeenifosforylaasi (fosforylaasi) pilkkoo glykogeenimolekyylin uloimpia suoria glukoosiketjuja, kunnes saavuttaa ketjujen haarautumiskohdan (Walker ja Whelan, 1960). Fosforylaasin mahdollisimman pitkälle pilkkomaa glykogeenimolekyylit kutsutaan glykogeenilimitdekstriiniksi. Glykogeenidebranching-entsyymi (GDE) purkaa haarautumiskohdan, minkä jälkeen fosforylaasi pystyy jatkamaan toimintaansa (Brown ja Illingworth-Brown, 1966; Nelson ym., 1969). Fosforylaasi on hyvin nopea entsyymi, yhteen glykogeenimolekyyliin sitoutuneet entsyymit pystyvät katalysoimaan jopa 30000 glukoosi-1-fosfaatti yksikön irtoamisen sekunnissa (Madsen ja Cori, 1958). Toisaalta on ehdotettu, että GDE rajoittaisi glykolyysin nopeutta (Yurovitzky ja Milman, 1975). Tätä tukevat useat tutkimukset, joissa on havaittu glykolyysin pysähtyvän yleensä ennen, kuin kaikki glykogeeni on pilkkoutunut (Lawrie, 1955; Monin ym., 1987; van Laack ja Kauffman, 1999; Immonen, 2000). Tästä huolimatta GDEn aktiivisuutta ei juuri ole tutkittu lihantuotantoeläimissä.

Tämän työn lähtökohtana oli hypoteesi, että alhainen GDE aktiivisuus verrattuna fosforylaasin aktiivisuuteen hidastaa pH-arvon laskua teurastuksen jälkeen. Tavoitteena oli tutkia lämpötilan ja pH-arvon vaikutusta GDEn aktiivisuuteen sian lihaksissa. Tutkimukseen valittiin kaksi energiametabolialtaan erilaista lihasta: vaalea, nopeasti supistuva glykolyyttinen ulkofile ja tumma, hitaasti supistuva, oksidatiivinen poskilihas.

## Aineisto ja menetelmät

Kahdentoista risteytysian ulkofileestä (*M. longissimus dorsi*) ja poskilihaksesta (*M. masseter*) otettiin lihasnäyte noin 35 minuuttia tainnutuksesta. Näytteet jäädytettiin nestemäisessä työssä ja varastoitiin siinä määritykseen asti. GDEn aktiivisuus määritettiin puhdistamattomasta lihasekstraktista käyttäen glykogeenilimitdekstriiniä substraattina. Tavoitteena oli saada aikaan olosuhteet, jotka ovat mahdollisimman lähellä GDEn luonnollista toimintaympäristöä. Aktiivisuuden määrittäminen perustui GDEn toiminnan tuloksena tapahtuvaan glykogeenilimitdekstriinin spektrin muuttumiseen glykogeenille ominaiseksi ja sen seuraamiseen spektrofotometrisesti. Menetelmä on kuvattu tarkemmin Kylä-Puhju ym. (2005). Lämpötilakäyrää varten GDEn aktiivisuus määritettiin neljän sian lihaksista pH-arvossa 6,3 lämpötiloissa 4, 15, 25, 35, 39, 42, 50 ja 60 °C. GDEn aktiivisuus määritettiin pH-käyrää varten kahdeksan sian lihaksista pH-arvoissa 5,6; 6,0; 6,2; 6,3; 6,4; 6,8 ja 7,2 lämpötilassa 39 °C.

Näytteiden glykolyyttinen potentiaali määritettiin Monin'in ym. (1987) mukaan näytteen kokonaisglukoosipitoisuuden ja laktaatin yhteismääränä. Kokonaisglukoosipitoisuus määritettiin hydrolysoimalla homogenoidun näytteen glykogeeni glukoosiksi suolahapossa (Lowry ja Passoneua, 1973)

ja määrittämällä hydrolysaatin glukoosipitoisuus Rochen määrityskitillä nro 1447521. Laktaattipitoisuus määritettiin samasta homogenaatista Boeringer-Mannheimin määrityskitillä nro 139084.

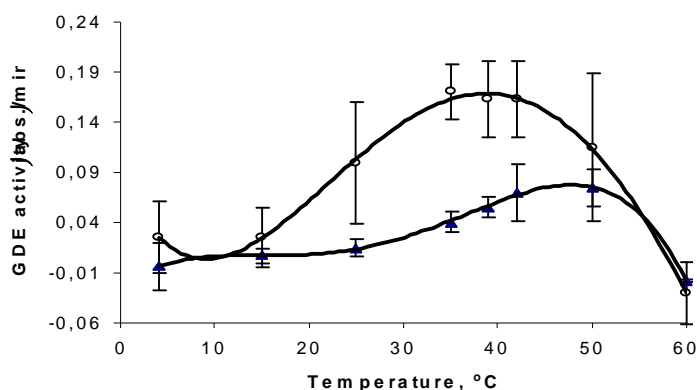
Fosforylaasin aktiivisuus määritettiin spektrofotometrisesti (340 nm) seuraamalla glukoosi-1-fosfaatin vapautumista glykogeenistä (Bass ym., 1969).

Tulokset analysoitiin Statistical Analysis System (SAS) versiolla 8.02. Parametrien estimaattien laskemiseen käytettiin reg-proseduuria ja LSMeans arvojen laskemiseen mixed-proseduuria. Lämpötila- ja pH-käyrät sovitettiin SAS/insight-ohjelmalla ja tulostettiin Microsoft Excell 97:llä. Entsyymiaktiivisuuden optimilämpötila ja -pH luettiin käyriä.

### Tulokset ja tulosten tarkastelu

GDEn aktiivisuus oli huomattavasti korkeampi vaaleassa glykolyttisessä ulkofileessä kuin tummassa oksidatiivisessa poskilihaksessa. Tulos oli odotettu, sillä ulkofileessä myös fosforylaasin aktiivisuus ja glykolyttinen potentiaali olivat korkeammat kuin poskilihaksessa (Taulukko 1). Kummassakin lihaksessa pH-arvon vaihtelulla oli vain vähäinen vaikutus GDEn aktiivisuuteen teurastuksen jälkeen esiintyvissä pH-arvoissa (5,6-7,2).

Teurastusprosessin aikana ruho jäädytetään 42 °C:sta neljään asteeseen. Ulkofileessä GDEn aktiivisuus oli korkeimmillaan heti teurastuksen jälkeen esiintyvissä lämpötiloissa (35-42 °C). Myös fosforylaasin aktiivisuuden tiedetään olevan korkein lämpötilan ollessa lähellä normaalia kehon lämpötilaa (Cori ym., 1943). Poskilihaksen lämpötilaoptimi oli korkeampi, noin 45 °C (Kuva 1). Vaikka lämpötilaoptimi vaikuttaa korkealta, se on kuitenkin lähellä jäniksen lihaksen GDElle raportoitua optimilämpötilaa, noin 50 °C (Nelson ja Watts, 1974). GDEn aktiivisuus alkoi nopeasti laskea, kun lämpötila laskettiin alle 35 °C. Aktiivisuus oli merkitsevästi ( $p < 0,001$ ) alempi ruhoissa jäädytyksen loppuvaiheessa esiintyvissä lämpötiloissa (4 ja 15 °C) kuin jäädytyksen alkaessa. Poskilihaksessa GDE oli käytännössä inaktiivinen lämpötilan laskettua alle 25 asteen, kun taas ulkofileen GDE säilytti aktiivisuutensa pidempään. Myös Nelson ja Watts (1974) raportoivat GDEn aktiivisuuden rajusta laskusta, kun lämpötila laskettiin 20 °C:hen.



Kuva 1, GDEn aktiivisuus sian ulkofileessä (o) ja poskilihaksessa (▲) lämpötilan funktiona.

On havaittu, että teurastuksen jälkeinen pH-arvon lasku usein pysähtyy ennen kuin kaikki lihaksen glykogeeni on pilkkoutunut. Saatujen tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että ruhon lämpötilan laskun aiheuttama GDEn toiminnan hidastuminen saattaa olla eräs pH-arvon laskun pysäyttävistä tekijöistä. Sian ulkofileen sisälämpötila laskee alle 35 °C:n noin tunnissa ruhoa jäädytettäessä. Sillä hetkellä pH on laskenut noin 6,3:een ja glykogeeni (mikäli lihasten glykogeenipitoisuus on teurastus-hetkellä ollut normaali tai korkea) on vielä muodossa, jota fosforylaasi voi pilkkoa. Siten lihasten lämpötila on laskenut merkittävästi teurastushetken lämpötilan alapuolelle ja kun GDEn toimintaa tarvitaan glykolyysin jatkumiseksi, sen aktiivisuus on merkittävästi alentunut.

GDEn rooli glykogeenin pilkkoutumisen nopeuden säätelyssä korostuu myös tilanteessa, jossa lihasten glykogeenivarastot ovat alentuneet jo ennen teurastusta. Glykogeenipitoisuuden ollessa alhainen, fosforylaasi saavuttaa glukoosiketjujen haarakohdan nopeasti, ja glykolyysin jatkuminen vaatii GDEn toimintaa. Otettaessa vielä huomioon glykogeenimolekyylin kerrosrakenne ja se, että jokaisessa kerroksessa on vain puolet sitä edeltävän kerroksen glukoosimäärästä (Goldsmith ym., 1982), GDEn

aktiivisuuden merkitys yhä korostuu. Mikäli GDEn aktiivisuus tällaisessa tilanteessa on alhainen, pH-arvon lasku hidastuu ja loppu-pH-arvo saattaa jäädä korkeaksi. Näillä tekijöillä on vaikutusta lihan laatuun.

Tummassa poskilihaksessa GDEn aktiivisuus oli alempi kuin vaaleassa ulkofileessä. Lämpötilan laskiessa poskilihaksen GDE aktiivisuus laski lähes nollaan nopeammin kuin ulkofileessä. Beecher ym. (1965) havaitsivat että sekä vaaleassa että tummassa osassa semitendinosus lihasta (pyöröpaisti) glykolyysi tapahtui nopeammin 37 °C:ssa kuin 4 °C:ssa. Mielenkiintoista heidän tuloksissaan oli, että vaalea osa lihasta saavutti saman loppu-pH-arvon kummassakin lämpötilassa kun taas tumman osan pH-arvo jäi korkeammaksi näytteissä, jotka säilytettiin alhaisessa lämpötilassa. Siten lämpötilan laskusta johtuva GDEn aktiivisuuden lasku saattaa olla glykolyysin pysäyttävä tekijä tummissa lihaksissa, johtaen korkeaan loppu-pH-arvoon. Poskilihas on ulkofileeseen verrattuna pieni lihas ja lähellä ruhon pintaa. Siten sen lämpötila myös laskee nopeammin ruhon jäähdtyksen yhteydessä. Glykokeenistä on maksimissaan 34,6 % suoraa fosforylaasin irrotettavissa (Meléndez-Hevia ym., 1993). Tämä määrä poskilihaksessa riittää pH-arvon laskemiseen seitsemästä noin kuuteen. Jotta glykolyysi jatkuisi edelleen, GDEn toimintaa tarvitaan glykokeenin haarakohtien purkamiseen. Kuitenkaan poskilihaksen pH ei yleensä laske juurikaan alle kuuden. Tämä saattaa johtua lämpötilan laskun aikaansaamasta GDEn toiminnan hidastumisesta.

Toisaalta GDEn riippumattomuus pH-arvosta ja entsyymien korkea aktiivisuus jopa lämpötilan kohotessa yli 45 °C:n mahdollistavat nopean glykolyysin ja pH-arvon laskun heti teurastuksen jälkeen. Nämä tekijät saattavat olla tärkeitä PSE (pale, soft, exudative) lihan synnyn kannalta, jossa pH laskee nopeasti lämpötilan ollessa korkea. GDE ei siis estä PSE lihan syntymistä, päinvastoin se toimii maksimaalisella nopeudella kyseisessä tilanteessa. Nopea jäähdtyys kuitenkin alentaa GDEn aktiivisuutta, hidastaa glykolyysin nopeutta ja siten vähentää PSE lihaisuutta.

Tässä tutkimuksessa havaittiin useiden edeltävien tutkimusten tavoin, että ulkofilee ja poskilihas ovat hyvin erityyppisiä lihaksia. Ulkofilee oli glykolyyttinen lihas, sen glykokeenipitoisuus ja glykolyyttisten entsyymien aktiivisuudet olivat korkeita johtaen nopeaan pH-arvon laskuun (Taulukko 1). Poskilihas puolestaan oli hyvin oksidatiivinen lihas. Glykolyyttinen potentiaali on estimaatti glykokeenipitoisuudesta teurastushetkellä (Monin ym., 1987).

Taulukko 1. Fosforylaasin aktiivisuus, glykolyyttinen potentiaali ja pH 35 min teurastuksesta (keskiarvot ja keskihajonnat) sian ulkofileessä ja poskilihaksessa (n=12).

	ulkofile	poskilihas	P
Fosforylaasi, U/g lihaa	14,2±3,2	2,1±0,7	***
Glykolyyttinen potentiaali, mmol laktaatti eq./kg lihaa	186,9±38,9	131,2±27,6	***
pH 35 min teurastuksesta	6,73±0,06	6,84±0,08	***

\*\*\* (P < 0,001)

## Johtopäätökset

GDEn ja fosforylaasin aktiivisuudet ovat korkeampia sian vaaleassa ulkofileessä kuin tummassa poskilihaksessa. Lämpötilan lasku alentaa huomattavasti GDEn aktiivisuutta kummassakin lihaksessa, kun taas pH-arvon laskulla lihassa teurastuksen jälkeen esiintyvissä arvoissa (7,2-5,6) on vain vähäinen vaikutus aktiivisuuteen. Lämpötilan laskun aiheuttaman GDEn aktiivisuuden aleneminen saattaa säädellä teurastuksen jälkeistä pH-arvon laskunopeutta ja vaikuttaa myös lihan loppu-pH-arvoon.

## Kirjallisuus

- Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S. & Pette, D.** 1969. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur.J.Biochem.* 10: 198-206.
- Beecher, G.R., Briskey, E.J. & Hoekstra, W.G.** 1965a. A comparison of glycolysis and associated changes in light and dark portions of the porcine semitendinosus. *J.Food Sci.* 30: 477-486.
- Brown, D.H. & Illinworth-Brown, B.I.** 1966. Enzymes of glycogen debranching: amylo-1,6-glucosidase (I) and oligo-1,4->1,4-glucantransferase (II). In: S.P. Colowick. & N.O. Kaplan (eds.) *Methods in Enzymology* (vol. 8 pp. 515-524). New York: Academic press.
- Cori, C.F., Cori, G.T. & Green, A.A.** 1943. Crystalline muscle phosphorylase. III. kinetics. *J.Biol.Chem.* 151: 39-55.
- Goldsmith, E., Sprang, S. & Fletterick, R.** 1982. Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods

and a model for glycogen. *J.Mol.Biol.* 156: 411-427.

**Gunja-Smith, Z., Marshall, J.J., Mercier, C., Smith, E.E. & Whelan, W.J.** 1970. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett.* 12: 101-104.

**Immonen, K.** 2000. Bovine muscle glycogen concentration in relation to diet, slaughter and ultimate beef quality. University of Helsinki, Department of Food Technology. Helsinki: University press.

**Kylä-Puhju, M., Ruusunen, M. & Puolanne, E.** 2005. Activity of porcine muscle glycogen debranching enzyme in relation to pH and temperature. *Meat Sci.* 69: 143-149.

**Lawrie, R.A.** 1955. Residual glycogen at high ultimate pH in horse muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 17: 282-283.

**Lomako, J., Lomako, W.M. & Whelan, W.J.** 2004. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim.Biophys.Acta* 1673: 45-55.

**Lowry, O.H. & Passoneau, J.V.** 1973. *A flexible system of enzymatic analysis.* New York: Academic Press.

**Madsen, N.B. & Cori, C.F.** 1958. The binding of glycogen and phosphorylase. *J.Biol.Chem.* 233: 1251-1256.

**Melendez-Hevia, E., Waddell, T.G. & Shelton, E.D.** 1993. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem.J.* 295: 477-483.

**Monin, G., Mejenes-Quijano, A. & Talmant, A.** 1987. Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Sci.* 20: 149-158.

**Nelson, T.E. & Watts, T.E.** 1974. The effect of denaturing conditions on the activity of rabbit muscle amylo-1,6-glucosidase-oligo-1,4 leads to 1,4-glucantransferase. *Mol.Cell.Biochem.* 5: 153-159.

**Nelson, T.E., Kolb, E. & Larner, J.** 1969. Purification and properties of rabbit muscle amylo-1,6-glucosidase-oligo-1,4-1,4-transferase. *Biochemistry* 8: 1419-1428.

**van Laack, R.L. & Kauffman, R.G.** 1999. Glycolytic potential of red, soft, exudative pork longissimus muscle. *J.Anim.Sci.* 77: 2971-2973.

**Walker, G.J. & Whelan, W.J.** 1960. The mechanism of carbohydrase action 8. Structures of the muscle-phosphorylase limit dextrans of glycogen and amylopectin. *Biochem. J.* 76: 264-268.

**Yurovitzky, Y.G. & Milman, L.S.** 1975. Amylo-1,6-glucosidase (debranching enzyme), a pacemaker of glycogenolysis in the early development of teleosts. *Ontogenez* 6: 291-295. In Russian.