



Vliv zpracování vzorků na výtěžnost N-acetylglukosaminu

Pospiech, M., Bartlová, M., Javůrková, Z., Tremlová, B.

Veterinární univerzita Brno



Abstrakt

Využití hmyzu v potravinářství je v EU na vzestupu, avšak doposud neexistuje referenční metoda na jeho průkaz. V článku byly ověřeny dvě deacetylační techniky pro zvýšení výtěžnosti chitinu, který se stanovoval metodou ELLA. Nejvyšší výtěžnost byla dosažena u nedeacetylovaných vzorků a to 99,62 % při koncentraci chitinu 2,5 mg/ml. S ohledem na vysokou SD je ale vhodnější dosáhnout nižších koncentrací chitinu vhodným ředěním. Při koncentraci 0,05 mg/ml chitinu byla výtěžnost 96,71 % s nízkou SD 4,66. Deacetylační techniky měly 10násobně nižší výtěžnost a nelze je tedy doporučit pro analýzu obsahu N-acetylglukosaminu jakožto indikátoru přítomnosti hmyzu v potravinách.

Úvod

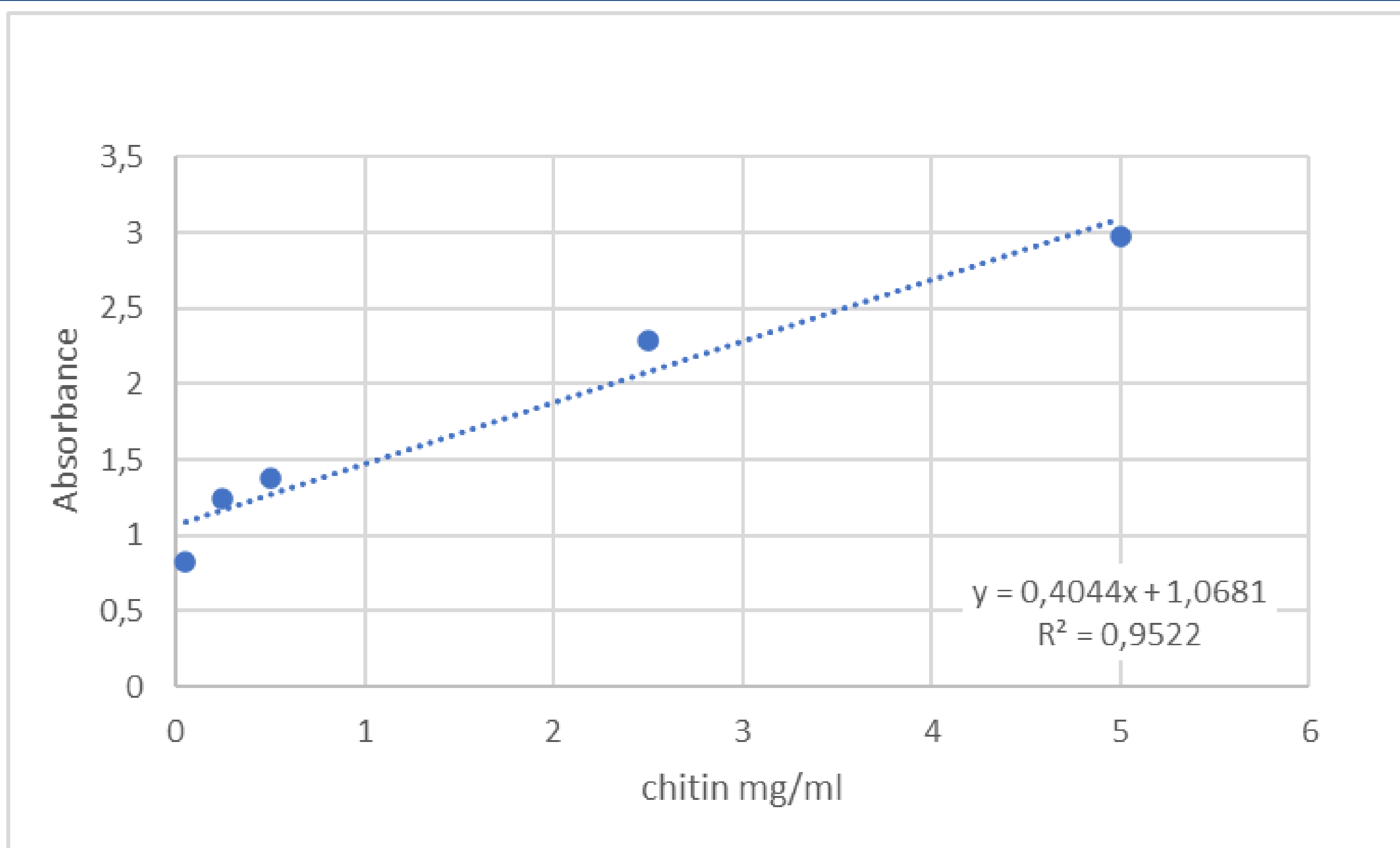
Používání hmyzu v potravinářství je na vzestupu. Umožňuje to jak změna legislativy, kdy využití některých druhů hmyzu je podle nařízení o nových potravinách povoleno, tak i obecná popularita těchto produktů roste. Za hlavní důvody rozšíření využívání jedlého hmyzu v potravinářství patří nižší uhlíková stopa, výroba splňující udržitelné hospodaření a také změna stravovacích návyků společnosti s odklonem od konzumace masa. Jako vedlejší produkt při zpracování hmyzu, a častěji také korýšů, je chitin. Chitin se v potravinářství nevyužívá kvůli své nízké rozpustnosti. Z tohoto důvodu se upravuje deacetylačními technikami, čímž vzniká lépe rozpustná forma chitinu, která se nazývá chitosan.

V EU není zatím zavedena jednotná metoda pro průkaz hmyzu v potravinách. V současnosti je publikována řada metod umožňujících průkaz hmyzu v potravinách, jako jsou ATR-FTNIR, PCR či elektroforetické metody. V rámci kolektivu autorů byla vyvinuta screeningová metoda založená na specifické vazbě lektinů na N-acetylglukosamin.

Cílem této studie bylo ověřit možnosti zvýšení výtěžnosti průkazu N-acetylglukosaminu pomocí techniky deacetylce chitinu.

Výsledky a diskuse

Pro výpočet dosažené koncentrace byl použit výpočet podle kalibrační křivky (Graf 1). Kalibrační závislost je v souladu s dříve dosaženými výsledky (Pospiech et al., 2024) a pohybuje se ve standardních rozmezích pro ELISA metody.



Graf 1: Kalibrační křivka pro standard chitinu

Dosažené hodnoty pro chitin, chitin HCL a chitin NaOH byly přepočteny na koncentraci a následně jsou vyjádřeny jako výtěžnost pro jednotlivé metody (Tabulka 1). Výtěžnost je důležitým parametrem pro hodnocení laboratorních metod. Nejvyšší výtěžnost byla dosažena u 2,5 mg/ml chitinu a to 99,62 %. I přes vysokou výtěžnost byl u této koncentrace zaznamenán vysoký rozptyl, kdy SD byla 30,12. Výborný výsledek byl dosažena také u 0,05 mg/ml chitinu, kde byla výtěžnost 96,71 % přičemž SD byla 4,66. Podle doporučení AOAC by se opakovatelnost měla pohybovat pod 20 %. Metodu lze tedy doporučit pro nižší koncentrace chitinu v potravinách nebo je nutné využívat dostatečného ředění v rámci doporučených rozmezí kalibrační křivky.

Závěr

Z výsledků vyplývá, že výtěžnost ELLA metody pro N-acetylglukosamin ze standardu chitinu, byla nejvyšší u koncentrace 2,5 mg/ml v nezpracovaném vzorku. Vysoká výtěžnost byla ale i u nižších koncentrací 0,5-0,05 mg/ml, kde ještě byla nižší chybovost měření vyjádřená jako SD. Pro ELLA metodu lze tedy doporučit ředit vzorky tak, aby se koncentrace chitinu pohybovala kolem 0,05-2,5 mg/ml. Zvýšení determinovaného N-acetylglukosaminu pomocí hydrolýzy HCL a NaOH nebyla potvrzena. Tento způsob zpracování vzorků je časově náročný a zvyšuje nároky na provedení metody.



MINISTERSTVO
ZEMĚDĚLSTVÍ



ZEMĚ
PROGRAM APLIKOVANÉHO VÝZKUMU
MINISTERSTVA ZEMĚDĚLSTVÍ
2017-2025

U vzorků po deacetylaci, tedy vzorků s označením chitinu HCL a chitinu NaOH, byla dosažena výtěžnost řádově 10násobně nižší (Tabulka 1).

Tabulka 1: Výtěžnost extrakčních metod

Koncentrace chitinu (mg/ml)	Chitin mg/ml	Chitin HCL mg/ml	Chitin NaOH mg/ml
5	72,16 ± 31,18	4,59 ± 0,20	5,04 ± 0,02
2,5	99,62 ± 30,12	9,56 ± 0,52	10,04 ± 0,04
0,5	71,28 ± 16,79	3,51 ± 0,48	4,21 ± 0,00
0,25	60,10 ± 16,16	2,49 ± 0,40	3,28 ± 0,01
0,05	96,71 ± 4,66	13,70 ± 0,68	16,27 ± 0,38

Nízká výtěžnost u deacetylačních technik poukazuje na to, že dochází k rozkladu makromolekuly chitinu. Lze se tedy domnívat, že při promývání mikrotitrační destičky a také filtraci vzorků, dochází k velkým ztrátám N-acetylglukosaminu, který byl převeden z nerozpustné formy na formu rozpustnou. Toto zjištění je však překvapivé, protože bylo předpokládáno, že dojde k deacetylaci chitinu na jeho rozpustnou formu chitosan a ne na jednotlivé monomerní jednotky

N-acetylglukosaminu. Po deacetylaci dochází ke změně velikosti polymeru chitinu, který má kolem 1000 kDa, na polymery o velikosti 26-300 kDa. Tato velikost by byla stále dostatečná pro průkaz pomocí ELLA metody. V některých případech, zejména při působení vyšších deacetylačních teplot, byla zaznamenána ještě menší velikost chitosanových polymerů, a to 3-97 kDa. Zajímavým zjištěním ale je, že všechny deacetylační techniky měly malé rozdíly mezi jednotlivými měřeními, což je zřejmě z nízké SD.

Materiál a metodika

Vzorek standardu chitinu byl připravený v koncentracích 5,0 - 0,05 mg/ml. Deacetylované vzorky byly připraveny pomocí 4 M HCL a 20 M NaOH. Deacetylce probíhala při 96 °C po dobu 17 hodin. Vzorky pro deacetylaci byly připraveny v koncentracích 5,0 - 0,05 mg/ml v celkovém množství 10 ml. Všechny vzorky byly připraveny a měřeny v duplikátech. ELLA metoda byla provedena podle. Mikrotitrační destička byla potažena nebiotinylovaným WGA lektinem přes noc. Následně byl inkubován standard chitinu, chitin HCL a chitin NaOH přes noc. Po inkubaci byl inkubován vzorek 1 hodinu s biotinylovaným WGA lektinem. Následně byl použit avidin-biotinový komplex s HRP peroxidázou, který byl zobrazen pomocí chromogenu TMB. Mezi jednotlivými kroky byly vzorky promývány 3x promývacím pufrem.

Literatura: Dostupná u autora

Poděkování: : Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství v rámci projektu ZEMĚ 2017-202 číslo QK23020101.

Kontaktní adresa: doc. MVDr. Matej Pospiech Ph.D., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE, VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, mpospiech@vfu.cz