

TERESA SMOLIŃSKA, EWA MALCZYK, ROBERT KRZOWSKI

ANALIZA HISTOCHEMICZNA LIPIDÓW MIĘŚNI JASNYCH I CIEMNYCH KURCZĄT ŻYWIONYCH PASZĄ WZBOGACONĄ W OLEJE ROŚLINNE I ALFA-TOKOFEROL

Streszczenie

Badano wpływ zmiennego dodatku oleju rzepakowego, nasion lnu i alfa-tokoferolu, na charakterystykę kropeł lipidowych obecnych w mięśniach kurcząt brojlerów - mieszańców międzyliniowych Vedetta. Do badań histochemicznych pobrano wycinki mięśnia piersiowego powierzchniowego *Musculus pectoralis thoracica* i mięśnia udowego *Musculus iliotibialis*. Analiza mikrostruktury dotyczyła oceny ilości, wielkości, kształtu, form występowania i miejsca zalegania kropeł lipidowych w tkance łącznej i sarkoplazmie. Badania wykonano przy zastosowaniu komputerowego systemu analiz obrazów mikroskopowych. Stwierdzono, że istnieje zależność pomiędzy ilością dodanego oleju rzepakowego, nasion lnu i alfa-tokoferolu do paszy a wielkością i sposobem rozmieszczenia kropeł lipidowych w tkance łącznej mięśni kurcząt i sarkoplazmie.

Wstęp

Aspekty żywieniowe i zdrowotne wywierają coraz większy wpływ na wybór żywności. Niska ilość tłuszczów zapasowych i cholesterolu w tuszkach drobiowych oraz specyficzne walory smakowe powodują, że mięso drobiu cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród konsumentów.

Jednym ze składników mięsa drobiowego, który wpływa na jego jakość jest tłuszcz. Skład chemiczny, w tym zawartość kwasów tłuszczowych lipidów mięsa kurcząt, może być zmieniony poprzez podawanie w mieszankach paszowych różnego rodzaju i ilości tłuszczów (roślinnych lub zwierzęcych), bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe. Zastosowanie w paszy dla drobiu olejów roślinnych zmienia skład kwasów tłuszczowych lipidów mięsa, poprzez zwiększenie udziału kwasów tłuszczowych z rodziny n-3, przez co polepszona zostaje wartość odżywcza mięsa drobiu [9, 10].

W ostatnim dziesięcioleciu ukazało się wiele prac na temat produkcji mięsa brojlerów wzbogaconego w polienowe kwasy tłuszczowe, poprzez wprowadzanie olejów roślinnych do paszy [5, 7, 8, 12, 14, 18]. Brak jest natomiast publikacji naukowych na temat wpływu dodawanych olejów roślinnych na budowę strukturalną kropeł lipidowych, stanowiących elementarny składnik budowy tkanki tłuszczowej.

Celem niniejszych badań było sprawdzenie, czy dodatek do paszy zmiennej ilości oleju rzepakowego i nasion lnu oraz alfa-tokoferolu ma wpływ na wielkość i strukturę ilościową kropeł lipidowych obecnych we włóknach mięśniowych (sarkoplazmie) i przylegającej tkance łącznej mięśni piersiowych i udowych kurcząt brojlerów. Równolegle starano się potwierdzić użyteczność komputerowej analizy obrazu w ocenie technologicznej surowca mięsnego.

Material i metody badań

Surowcem do badań były tuszki 6-tygodniowych kurcząt brojlerów mieszańców międzyliniowych Vedetta z firmy ISA. Kurczęta żywione były mieszanką standardową DKA-AF z dodatkiem oleju pochodzenia roślinnego:

- Grupa I – pasza z dodatkiem oleju rzepakowego w ilości 2,75%, alfa-tokoferol 0,015%;
- Grupa II – pasza z dodatkiem oleju rzepakowego w ilości 5,5%, alfa-tokoferol – 0,0225%
- Grupa III – pasza z dodatkiem oleju rzepakowego w ilości 2,75% oraz 4% nasion lnu, dodatkowo alfa-tokoferol w ilości 0,0225%
- Grupa IV – pasza z dodatkiem oleju rzepakowego w ilości 8,25%, alfa-tokoferol 0,03%.

Do badań histologicznych pobierano wycinki (próbki) mięśnia piersiowego powierzchniowego *Musculus pectoralis thoracica* i mięśnia udowego *Musculus iliotibialis*, które pochodziły z tuszek 24 godz. *post mortem*, schłodzonych do temp. +4°C.

Wycinki utrwalano zobojętnionym roztworem formaliny i poddawano rutynowej procedurze histologicznej w celu otrzymania preparatów mikroskopowych. Wyplukane wycinki zatapiało w 15–30% roztworze żelatyny [19], bloczki żelatynowe po zamrożeniu kroją na mikrometrowe skrawki, a następnie barwiono barwnikiem Sudan III. Wynikiem barwienia Sudanem III jest wybarwienie wszystkich tłuszczów na kolor pomarańczowy [1].

Preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu optycznego Axiskop ZEISS. Komputerową analizę obrazu mikroskopowego prowadzono systemem „Kontron Elektronik Imaging System”, z wykorzystaniem programu komputerowego KS 100 2.0. Fotografie rozmieszczenia lipidów w tkance mięśniowej wykonano przy powiększeniu (20x10).

Oceniano mikrostrukturę lipidów obecnych w tkance łącznej i w sarkoplazmie. Analizowano 20 różnych pól o stałej, określonej powierzchni, przy powiększeniu mikroskopu 40x10. Określano następujące parametry: liczbę struktur tłuszczowych, średnicę minimalną, współczynnik kulistości (kształtu), którego miarą jest współczynnik osiowy q – stosunek długości do szerokości przekroju.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu programu statystycznego Statgraphics 5.1.

Wyniki i dyskusja

W przypadku badania struktur komórkowych (tkankowych) o kształtach owalnych, okrągłych lub nieregularnych, średnica zależy od płaszczyzny cięcia. Krople tłuszczu, które były obiektami pomiarowymi mają w większości przypadków kształt elipsy obrotowej, w związku z czym posiadają dwie średnice: minimalną (tzw. oś krótką) oraz maksymalną (tzw. oś długą). Na podstawie badań Kassnera i Kuryszko [4] wykazano, że pomiar średnicy minimalnej (osi krótkiej) w płaszczyźnie środkowej struktur komórkowych o kształcie owalnym dają wartości reprezentatywne.

Na podstawie średnic minimalnych określono rozkład wielkości kropeł lipidowych w badanym materiale. Otrzymanie informacji na temat rozkładu wielkości kropeł tłuszczowych w mięśniu jest zadaniem trudniejszym niż oszacowanie średniej wielkości, daje jednak więcej informacji na temat zmienności kropeł tłuszczowych zawartych w mięśniach, zwłaszcza przy zróżnicowanym poziomie tłuszczu w paszy.

Empiryczny rozkład kropeł lipidowych w zależności od ich wielkości został podzielony na przedziały wielkości średnic (od 0 do 110 μm) i rzeczywistą liczebność kropeł w danym przedziale wielkości wyrażonych w [%], co przedstawiono w tab. 2. (w tkance łącznej) i 3. (w sarkoplazmie).

Parametrem, który często może być uważany za cechę jakościową o drugorzędym znaczeniu jest współczynnik kształtu (kulistości). W istocie kształt można określić parametrami ilościowymi. Kształt kropli tłuszczowej jest równie ważny jak jej wielkość i liczba. Większość cząstek wchodzących w skład organizmów żywych może być sklasyfikowana jako kuliste lub elipsoidalne [6].

Zmienność wielkości i liczebności kropeł lipidowych obecnych w tkance łącznej mięśni piersiowych i udowych

Doświadczalna grupa pierwsza, w której kurczęta były żywione paszą z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego, charakteryzowała się najmniejszą ilością zliczonych kropeł lipidowych, zarówno w mięśniach piersiowych, jak i udowych. W 20 polach obserwacyjnych preparatów mięśni piersiowych zanotowano obecność 170 przekrojów kropeł lipidowych. W mięśniach udowych natomiast 276 kropeł, czyli ponad 1,5-krotnie więcej (tab. 1, fot. 1). Wcześniejsze badania Malczyk [10] potwierdziły, że

zawartość tłuszczu oznaczona za pomocą komputerowej analizy obrazu ściśle koreluje z zawartością tłuszczu oznaczoną metodami chemicznymi, gdzie w mięśniach jasnych zawartość tłuszczu wynosiła około 2,2%, a w mięśniach ciemnych około 7,4%.

Tabela 1

Rozmieszczenie różnych struktur kropeł tłuszczowych w tkance łącznej i w sarkoplazmie mięśni piersiowych oraz udowych kurcząt.

Distribution of different lipid droplet structures in connective tissue and in sarcoplasm of chicken breast and thigh muscles.

Rodzaj mięśni Kind of muscles	Dodatek tłuszczowy do paszy [%]/ Oil addition to the fodder	Liczba zmierzonych kropeł lipidowych/ Number of measured lipid droplets		
		w tkance łącznej in adipose tissue	o zmienionej strukturze – w tkance łącznej / structurally changed - in adipose tissue	w sarkoplazmie in sarcoplasm
Mięśnie piersiowe/ Breast muscles	2,75 % oleju rzepakowego/rape-seed oil	170	27	60
	5,5 % oleju rzepakowego/rape-seed oil	441	103	95
	2,75 % oleju rzepakowego /rape-seed oil/ i 4% nasion lnu /flax seed/	307	54	98
	8,25 % oleju rzepakowego /rape-seed oil	440	117	96
Mięśnie udowe/ Thigh muscles	2,75 % oleju rzepakowego /rape-seed oil	276	70	49
	5,5 % oleju rzepakowego /rape-seed oil	475	94	56
	2,75 % oleju rzepakowego /rape-seed oil/ i 4% nasion lnu /flax seed/	623	81	80
	8,25 % oleju rzepakowego /rape-seed oil	383	114	72

* zmienione struktury w formie nacieków (changed structures in form of infiltrations)

W mięśniach piersiowych, największą populację tworzyły krople tłuszczowe o średnicach 10–20 μm , co stanowiło 54,7% ogólnej liczebności kropeł (tab. 2). Pozostałe wielkości kropeł mieściły się w granicach 30–40 μm oraz o średnicy poniżej 10 μm . Średnia arytmetyczna średnic wynosiła 19,63 μm i była to najniższa średnia z wszystkich badanych grup żywieniowych (tab. 4).

Tabela 2

Liczba, udział i średni współczynnik kształtu kropeł lipidowych, w zależności od wielkości ich średnic w tkance łącznej mięśni piersiowych i udowych kurcząt.

Number of diameters, percentage and average coefficient of shape of lipid droplets present in connective tissue of breast and thigh chicken muscles.

Dodatek tłuszczowy do paszy [%] Oil addition to the fodder	Przedziały wielkości średnic Range of diameter size [µm]	Mięśnie piersiowe / Breast muscles			Mięśnie udowe / Thigh muscles		
		Liczba kropeł lipidowych Number of lipid droplets	Udział kropeł lipidowych [%] Percentage of lipid droplets	Średni współczynnik kształtu Average coefficient of shape	Liczba kropeł lipidowych Number of lipid droplets	Udział kropeł lipidowych [%] Percentage of lipid droplets	Średni współczynnik kształtu Average coefficient of shape
2,75% oleju rzepakowego / rape-seed oil	0 – 10	26	15,3	0,77	45	16,4	0,73
	10 – 20	93	54,7	0,76	152	55,3	0,78
	20 – 30	27	15,9	0,72	45	16,4	0,81
	30 – 40	9	5,3	0,70	7	2,4	0,79
	40 – 50	4	2,3	0,67	10	3,4	0,76
	50 – 60	5	2,9	0,71	7	2,4	0,75
	60 – 70	4	2,4	0,72	3	1,1	0,83
	70 – 80	2	1,2	0,76	3	1,1	0,83
	80 – 90	0	0	0	3	1,1	0,83
	90 – 100	0	0	0	1	0,4	0,80
pow. 110	0	0	0	0	0	0	
5,5% oleju rzepakowego / rape-seed oil	0 – 10	14	4,6	0,69	38	5,6	0,69
	10 – 20	134	43,6	0,78	199	37,6	0,79
	20 – 30	49	16,0	0,80	160	23,5	0,81
	30 – 40	28	9,1	0,79	82	12,0	0,83
	40 – 50	24	7,8	0,82	36	5,2	0,82
	50 – 60	17	5,5	0,78	36	5,2	0,81
	60 – 70	17	5,5	0,76	30	4,4	0,83
	70 – 80	12	4,0	0,82	21	3,2	0,84
	80 – 90	7	2,3	0,85	17	2,5	0,84
	90 – 100	4	1,3	0,86	5	0,8	0,89
pow. 110	1	0,3	0,82	0	0	0	
2,75% oleju rzepakowego i 4% nasion lnu / rape-seed oil/ i 4% na- sion lnu /flax seed	0 – 10	38	8,6	0,73	3	0,7	0,79
	10 – 20	79	18,0	0,75	96	20,3	0,80
	20 – 30	76	17,2	0,74	69	14,6	0,79
	30 – 40	62	14,0	0,76	64	13,5	0,78
	40 – 50	50	11,3	0,75	43	8,5	0,78
	50 – 60	41	9,4	0,76	47	10,0	0,76
	60 – 70	39	8,8	0,80	57	12,2	0,79
	70 – 80	21	4,8	0,82	40	8,5	0,81
	80 – 90	14	3,2	0,83	30	6,3	0,84
	90 – 100	12	2,7	0,85	19	4,0	0,84
pow. 110	8	1,8	0,85	5	1,0	0,85	
8,25% oleju rzepakowego / rape-seed oil	0 – 10	21	4,8	0,72	26	6,8	0,67
	10 – 20	228	52,1	0,74	177	46,2	0,72
	20 – 30	97	22,1	0,76	108	28,2	0,70
	30 – 40	55	12,5	0,72	47	12,3	0,67
	40 – 50	22	5,0	0,76	17	4,4	0,73
	50 – 60	12	2,7	0,75	8	2,1	0,75
	60 – 70	2	0,4	0,82	0	0	0
	70 – 80	1	0,2	0,89	0	0	0
	80 – 90	1	0,2	0,88	0	0	0
	90 – 100	0	0	0	0	0	0
pow. 110	0	0	0	0	0	0	

Tabela 3

Liczba, udział i średni współczynnik kształtu kropeł lipidowych obecnych w sarkoplazmie mięśni piersiowych i udowych kurcząt

Number of diameters, percentage and average coefficient of shape of lipid droplets present in sarcoplasm of breast and thigh chicken muscles

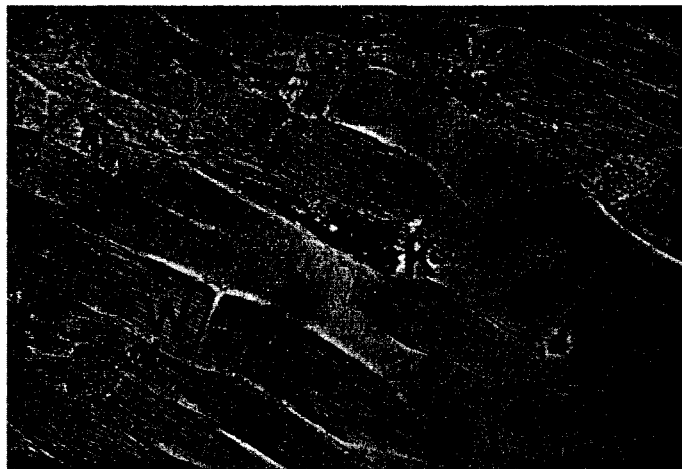
Dodatek tłuszczowy do paszy [%] Oil addition to the fodder	Przedziały wielkości średnic Range of diameter size [μm]	Mięśnie piersiowe / Breast muscles			Mięśnie udowe / Thigh muscles		
		Liczba kropeł lipidowych Number of lipid droplets	Udział kropeł lipidowych [%] Percentage of lipid droplets	Średni współczynnik kształtu Average coefficient of shape	Liczba kropeł lipidowych Number of lipid droplets	Udział kropeł lipidowych [%] Percentage of lipid droplets	Średni współczynnik kształtu Average coefficient of shape
2,75% oleju rzepakowego / rape-seed oil	0 – 5	0	0	0	5	10,2	0,82
	5 – 10	30	50	0,85	21	42,8	0,86
	10 – 15	18	30	0,85	10	20,5	0,85
	15 – 20	4	6,7	0,88	5	10,2	0,84
	20 – 25	2	3,3	0,87	5	10,2	0,88
	25 – 30	4	6,7	0,86	0	0	0,86
	30 – 35	2	3,3	0,86	3	6,1	0,85
	35 – 40	0	0	0,83	0	0	0
5,5% oleju rzepakowego / rape-seed oil	0 – 5	3	3,1	0,88	0	0	0,86
	5 – 10	42	43,0	0,87	21	26,3	0,87
	10 – 15	24	24,5	0,86	37	46,3	0,87
	15 – 20	6	6,1	0,87	15	18,7	0,89
	20 – 25	17	17,2	0,89	3	3,7	0,89
	25 – 30	4	4,1	0,88	3	3,7	0,88
	30 – 35	2	2,0	0,87	1	1,3	0,88
	35 – 40	0	0	0	0	0	0
2,75% oleju rzepakowego i 4% nasion lnu / rape-seed oil / 4% nasion lnu / flax seed	0 – 5	0	0	0	2	3,6	0,89
	5 – 10	4	4,2	0,88	5	8,9	0,87
	10 – 15	7	7,4	0,87	5	8,9	0,88
	15 – 20	16	16,8	0,86	9	16,1	0,87
	20 – 25	23	24,2	0,86	5	8,9	0,89
	25 – 30	25	26,3	0,88	18	32,1	0,86
	30 – 35	16	16,8	0,89	9	16,1	0,85
	35 – 40	4	4,3	0,82	3	5,4	0,83
8,25% oleju rzepakowego / rape-seed oil	0 – 5	0	0	0	0	0	0,87
	5 – 10	34	39,5	0,88	7	9,7	0,88
	10 – 15	34	39,5	0,87	15	21,0	0,89
	15 – 20	12	14	0,88	33	45,8	0,88
	20 – 25	3	3,5	0,89	13	18,0	0,85
	25 – 30	3	3,5	0,87	0	0	0
	30 – 35	0	0	0	0	0	0
	35 – 40	0	0	0	4	5,5	0,84



Fot. 1. Przekrój podłużny przez mięsień piersiowy kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego (pow. 200x).

Fig. 1. Breast muscle of broiler fed with addition to 2,75% rape oil (magn. x200).

K - krople tłuszczu / lipid droplets; S - krople tłuszczu w sarkoplazmie / lipid droplets in sarcoplasm; N - nacieki tłuszczowe / lipids infiltrations; W - włókna mięśniowe / muscles fibres; T - tkanka łączna / connective tissue.



Fot. 2. Przekrój podłużny przez mięsień udowy kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego (pow. 200x).

Fig. 2. Thigh muscle of broiler fed with addition to 2,75% rape oil (magn. x200).

K - krople tłuszczu / lipid droplets; W - włókna mięśniowe / muscle fibres.

W mięśniach udowych (tab. 2), podobnie jak w mięśniach piersiowych, najliczniejszą populację tworzyły krople o średnicach 10–20 μm , co stanowiło 55,3% liczeb-

ności kropel. Średnia arytmetyczna wynosiła 19,94 μm i należała również do najniższych średnic (tab. 4, fot. 2).

Tabela 4

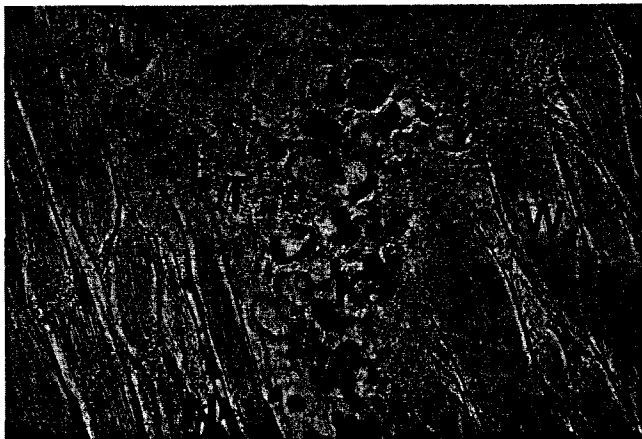
Analiza statystyczna średnic kropel lipidowych w tkance łącznej i sarkoplazmie mięśni piersiowych i udowych kurcząt.

Statistical analysis of lipid droplets diameters in connective tissue and sarcoplasm in breast and thigh chicken muscles.

Rodzaj mięśni Kind of muscles	Dodatek tłuszczowy do paszy [%]/ Oil addition to the fodder	Tkanka łączna Adipose tissue		Sarkoplazma Sarcoplasm	
		średnia arytmetyczna average value [μm]	odchylenie standardowe standard deviation	średnia arytmetyczna average value [μm]	odchylenie standardowe standard deviation
Mięśnie piersiowe Breast muscles	2,75 % oleju rzepakowego/ rape-seed oil	19,63	15,02	9,06	3,27
	5,50 % oleju rzepakowego/ rape-seed oil	29,15	19,83	13,28	7,21
	2,75 % oleju rzepakowego / rape-seed oil/ i 4% nasion lnu / flax seed	45,74	25,36	24,5	6,99
	8,25 % oleju rzepakowego/ rape-seed oil	21,55	10,39	12,59	4,81
Mięśnie udowe Thigh muscles	2,75 % oleju rzepakowego/ rape-seed oil	19,94	13,68	12,02	7,42
	5,50 % oleju rzepakowego/ rape-seed oil	30,29	21,67	13,71	5,34
	2,75 % oleju rzepakowego / rape-seed oil/ i 4% nasion lnu / flax seed	48,28	26,12	23,66	9,14
	8,25 % oleju rzepakowego / rape-seed oil	22,10	11,77	18,19	6,77

Dodatek 4% nasion lnu, do paszy zawierającej 2,75% oleju rzepakowego (grupa III), szczególnie istotnie wpłynął na wzrost ilości kropel tłuszczowych, zarówno w mięśniach piersiowych, jak i udowych (fot. 3, 4). W mięśniach piersiowych stwierdzono w 20 polach obserwacyjnych 307 kropel lipidowych, co stanowiło blisko 2-krotny

wzrost zliczonych kropeł w stosunku do grupy I (2,75% oleju rzepakowego) (tab. 1). W mięśniach udowych zanotowano 2-krotny wzrost liczby kropeł, a ich ilość wynosiła 623 oraz wysoko istotną różnicę w stosunku do ilości kropeł tłuszczowych zliczonych w tych samych mięśniach w grupie I. Dodatek 4% nasion lnu spowodował nie tylko wzrost ilościowy zliczonych kropeł, ale również obserwowano przewagę kropeł o dużych i bardzo dużych średnicach, zarówno w mięśniach piersiowych, jak i w mięśniach udowych (tab. 2).



Fot. 3. Przekrój podłużny przez mięsień piersiowy kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego i 4% nasion lnu (pow. 200x).

Fig. 3. Breast muscle of broiler fed with addition to 2,75% rape oil and 4% flax seeds (magn. x200).

K - krople tłuszczu / lipids droplets; N - nacieki tłuszczowe / lipid infiltrations; W - włókna mięśniowe / muscle fibres; T - tkanka łączna / connective tissue.

Za krople duże można uważać te o średnicach powyżej 40 μm i stanowiły one ponad 40% kropeł w mięśniach piersiowych i 50% w mięśniach udowych.

Dodatek 4% nasion lnu spowodował ponad 2-krotne powiększenie średniej średnic w stosunku do grupy kurcząt żywionych paszą wyłącznie z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego. Prawidłowość tę obserwowano w obu badanych mięśniach (tab. 4).

Dodatek do paszy zwiększonej ilości oleju rzepakowego, do poziomu 5,5%, spowodował łącznie wzrost średniej średnic o 1/3 w stosunku do grupy (I), z najniższym dodatkiem oleju (tab. 4).

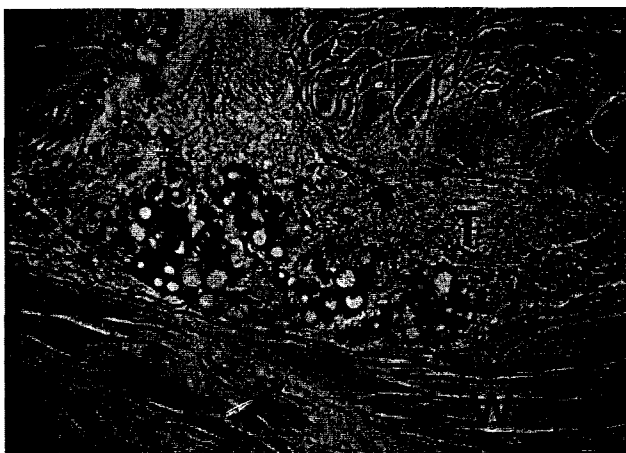
Dodatek 5,5% oleju rzepakowego do paszy istotnie wpłynął na zwiększenie rozproszenia kropeł tłuszczowych w mięśniach piersiowych, przy zwiększonej liczebności w stosunku do grupy z najniższym dodatkiem oleju rzepakowego. Zliczono, w wytypowanych polach obserwacyjnych mięśni piersiowych, ponad 441 kropeł lipidowych, czyli ponad 2,5-krotnie, więcej w stosunku do wariantu o niższym dodatku oleju

(2,75%), a 1,5-krotnie więcej w stosunku do wariantu z dodatkiem nasion lnu (grupa III) (tab. 1). Dodatek 8,25% oleju rzepakowego do paszy nie wpłynął na zwiększenie ilości zliczonych kropeł tłuszczowych w mięśniach piersiowych, w stosunku do grupy kurcząt żywionej paszą z dodatkiem 5,5% oleju (tab. 1). Miał natomiast istotny wpływ



Fot. 4. Przekrój podłużny przez mięsień udowy kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego i 4% nasion lnu (pow. 200x).

Fig. 4. Thigh muscle of broiler fed with addition to 2,75% rape oil and 4% flax seeds (magn. x200).
K - krople tłuszczu / lipid droplets; N - nacieki tłuszczowe / lipid infiltrations; W - włókna mięśniowe / muscle fibres; T - tkanka łączna / connective tissue.



Fot. 5. Przekrój podłużny przez mięsień piersiowy kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 8,25% oleju rzepakowego (pow. 200x).

Fig. 5. Breast muscle of broiler fed with addition to 8,25% rape oil (magn. x200).
K - krople tłuszczu / lipid droplets; W - włókna mięśniowe / muscle fibres; T - tkanka łączna / connective tissue.

na wielkość kropeł, ponieważ zdecydowanie dominował udział drobnych kropeł tłuszczowych w zakresie 10–20 μm (tab. 2, fot. 5). Uwidocznił się, w sposób przewidywany, wpływ większego dodatku oleju rzepakowego na rozmieszczenie oraz ilość tłuszczu w tkance łącznej badanych mięśni. Można zatem stwierdzić, że wraz ze wzrostem dodawanego oleju do paszy zwiększyła się proporcja udziału drobnych kropeł lipidowych w stosunku do kropeł dużych.

Analogicznie jak w mięśniach piersiowych, tak i w mięśniach udowych, 5,5% dodatek oleju rzepakowego do paszy spowodował istotny (ponad 1,5-krotny) wzrost liczebności kropeł tłuszczowych o najmniejszych średnicach (tab. 1, fot. 6). Przy dodatku tłuszczu roślinnego (8,25% – grupa IV) w mięśniach udowych zaobserwowano tendencję do zmniejszania ilości dobrze zachowanych struktur kropeł lipidowych na rzecz zwiększającej się liczby nacieków tłuszczowych (tab. 1).



Fot. 6. Przekrój podłużny przez mięsień udowy kurcząt żywionych paszą z dodatkiem 5,5% oleju rzepakowego (pow. 200x).

Fig. 6. Thigh muscle of broiler fed with addition to 5,5% rape oil (magn. x200).

K - krople tłuszczu / lipid droplets; N - nacieki tłuszczowe / lipid infiltrations; W - włókna mięśniowe / muscle fibres; T - tkanka łączna / connective tissue.

Według Grabowskiego [2], do 4. tygodnia życia kurcząt, wzrost zawartości tłuszczu w mięśniach wiąże się ze zwiększeniem liczby komórek tłuszczowych. W okresie od 4. do 6. tygodnia liczba komórek jest stała, a od 6. tygodnia ulega zmniejszeniu. Oznacza to, że od 4. tygodnia życia kurcząt wzrost zawartości tłuszczu jest związany z powiększaniem się komórek tłuszczowych.

Wyliczone średnie współczynniki kształtu potwierdzają powyższe stwierdzenia. Współczynniki kształtu przyjmują wartości od 0 do 1 (gdzie 1 oznacza idealną strukturę kulistą). Średnie wartości współczynników kształtu w tkance łącznej mięśni piersiowych i udowych wskazują na dużą zmienność kształtów kropeł lipidowych. Wyż-

szymi współczynnikami charakteryzowały się krople duże o średnicach ponad 60 μm , w których stosunek osi krótkiej do osi długiej jest najmniejszy. Krople duże ułożone są centralnie w agregatach (złogach) (tab. 2, fot. 3, 4, 5) grupujących dużą ilość kropeł tłuszczowych, a wolne przestrzenie między nimi uzupełniają drobne krople. Stwierdzono powstawanie tzw. nacieków tłuszczowych wyłącznie w tkance łącznej, natomiast nie zaobserwowano tego typu struktur w sarkoplazmie badanych mięśni (tab. 1). Ilość występujących zmienionych struktur komórkowych lipidów zlokalizowanych w przestrzeniach międzykomórkowych oraz pomiędzy pęczkami jest proporcjonalna do ilości dodatków tłuszczowych w paszy. W obu badanych mięśniach widać obecność maksymalnej ilości nacieków przy dodatku 8,25% oleju rzepakowego do paszy. Przy wzrastającym dodatku oleju do paszy występowała tendencja do zmniejszania się liczby pojedynczych kropeł tłuszczowych na rzecz tworzenia się agregatów (fot. 5). Powstałe tego typu struktury tłuszczowe nie są naturalną formą występowania lipidów w mięśniach. Powstają one prawdopodobnie w wyniku rozpadu lub pęknięcia największych kropeł tłuszczowych, znajdujących się w tkance łącznej. Dodatek 5,5% oleju rzepakowego do paszy był wartością graniczną, przy której krople lipidowe pozostały nienaruszone, zachowując jeszcze prawidłową strukturę i funkcję. Obecność tego typu struktur tłuszczowych w mięśniach może nieść wiele konsekwencji technologicznych. Według badań Hoogenkampa [3], obecność w mięsie uszkodzonych komórek tłuszczowych wpływa w znacznym stopniu na wynik obróbki cieplnej i wydajność procesu oraz może powodować zmiany w teksturze.

Kolejnym ważnym zagadnieniem, związanym ze wzbogacaniem pasz w oleje roślinne (o dużym stopniu nienasyconia), jest zwiększenie udziału nienasyconych składników w błonach komórkowych mięsa, a dalej w konsekwencji rozpad kropeł lipidowych, który powoduje zwiększenie podatności lipidów na procesy utleniania [16, 17].

Jelczenie lipidów mięsa zachodzi na skutek utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie polienowych, zawierających dwa lub więcej wiązań podwójnych występujących w znaczących ilościach w fosfolipidach [13]. Przypuszcza się, że utlenianie lipidów mięsa zostaje zainicjowane na poziomie błon komórkowych i rozpoczyna się bezpośrednio po uboju. Biorąc pod uwagę tendencje wzrostu zainteresowania żywnością zawierającą nienasycone lipidy, należy liczyć się z tym, że będą to produkty bardziej podatne na procesy utleniania [7]. Obecność nacieków tłuszczowych obserwowanych w niniejszych badaniach może potęgować procesy oksydacji. Ponadto każda ingerencja w integralność błon komórkowych, poprzez mechaniczne (zabiegi) procesy, prowadzi do fragmentaryzacji błon komórkowych i ich uszkodzenia. Procesy te ułatwiają kontakt prooksydantów z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi [15].

Jednym z możliwych rozwiązań, mających za zadanie ograniczyć procesy utleniania, jest podawanie w mieszankach paszowych dla drobiu związków witaminowo-E aktywnych. Wzbogacenie paszy tokoferolami prowadzi do odkładania się tych zwią-

ków w tkankach, co w konsekwencji ogranicza utlenianie lipidów mięsa. Ten korzystny efekt jest wynikiem wbudowania się tych związków w błony komórkowe, gdzie zwiększają pojemność przeciwutleniającą systemu i na drodze fizycznej bliskości z polienowymi kwasami tłuszczowymi ograniczają ich podatność na utlenianie. We wcześniejszych badaniach [9] wykazano, że dodatek alfa-tokoferolu do paszy w ilości 0,02% powoduje około 2,0% wzrost zawartości związków witaminowo-E aktywnych w postaci alfa-tokoferolu i octanu alfa-tokoferolu, w mięśniach kurcząt.

Zmienność wielkości i liczebności kropeł lipidowych obecnych w sarkoplazmie mięśni piersiowych i udowych

Generalnie stwierdzono mniejszą ilość kropeł tłuszczowych w sarkoplazmie mięśni piersiowych i udowych, w stosunku do ilości kropeł obecnych w tkance łącznej (tab. 1). Zaobserwowano również mniejsze zróżnicowanie kropeł tłuszczowych pod względem wielkości średnic niż miało to miejsce w tkance łącznej, bowiem nie stwierdzono obecności kropeł o średnicach przekraczających 40 μm . Dlatego w celu zobrazowania rozkładu średnic konieczne było stworzenie mniejszych przedziałów wielkości kropeł tłuszczowych (tab. 3). W sarkoplazmie nie zaobserwowano obecności nacieków tłuszczowych.

Doświadczalna grupa pierwsza, skarmiana paszą z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego, charakteryzowała się dużą populacją kropeł najdrobniejszych, zarówno w mięśniach piersiowych jak i udowych, w przedziałach 5–10 μm oraz 10–15 μm (tab. 3). W mięśniach piersiowych udział tych dwóch frakcji stanowił aż 80 % liczby kropeł tłuszczowych tych mięśni, w tej grupie żywieniowej, natomiast mięśni udowych 63,2%.

Dodatek 4% nasion lnu do paszy, zawierającej 2,75% oleju rzepakowego, spowodował, że w mięśniach piersiowych nastąpiło przesunięcie wielkości kropeł w kierunku większego udziału frakcji zawierającej krople o średnicach 20–25 μm oraz 25–30 μm (tab. 3). Natomiast w sarkoplazmie mięśni udowych tej grupy żywieniowej nastąpiło większe wyrównanie liczebności kropeł lipidowych w poszczególnych przedziałach (frakcjach), z tendencją do zwiększania rozmiarów średnic. Jak wynika z zestawienia średnich średnic arytmetycznych poszczególnych grup (tab. 4), dodatek 4 % nasion lnu spowodował (podobnie jak w przypadku kropeł lipidowych obecnych w tkance łącznej) około 2-krotne powiększenie średniej średnicy w stosunku do grupy z dodatkiem 2,75% oleju rzepakowego. Prawidłowość tę można zaobserwować zarówno w przypadku mięśni piersiowych, jak i udowych.

Dodatek tłuszczu do paszy w ilości 5,5% oleju rzepakowego, spowodował sukcesywne zwiększanie liczebności kropeł najdrobniejszych (tab. 3).

Zwiększony dodatek oleju rzepakowego nie powodował istotnych różnic w zakresie średnich arytmetycznych średnic w stosunku do grupy z najniższym dodatkiem tłuszczowym (tab. 4).

Dodatek oleju rzepakowego do poziomu 8,25% nie powodował dalece istotnych zmian w zakresie rozkładu rozmiarów średnic kropeł lipidowych. Zauważono jednak dalszy wzrost liczebności kropeł najdrobniejszych, o średnicach poniżej 20 μm (tab. 3).

Średnie współczynniki kształtu przedziałów rozkładu średnic kropeł obecnych w sarkoplazmie mięśni piersiowych oraz udowych charakteryzowały się mniejszą zmiennością niż miało to miejsce w przypadku kropeł lipidowych obecnych w tkance łącznej. Rozpiętość współczynników zamykała się w granicach od 0,82 do 0,89 (tab. 3). W dominującej większości wartość współczynnika kształtu w niewielkim zakresie odbiegała od wartości 1 (kształt zbliżony do kuli) (tab. 3), co wskazuje na małe zróżnicowanie kształtów.

Podsumowanie

Interesującym, a nie rozpoznany dotychczas zagadnieniem jest zmiana struktur komórek lipidowych mięsa drobiu, w wyniku wzbogacania pasz w oleje roślinne oraz tokoferole. Prowadzone obserwacje nad strukturą lipidów tkankowych wyraźnie wskazały, że zarówno ilość jak i rodzaj dodawanych olejów i nasion do mieszanek paszowych powodowały powstawanie różnych struktur komórek lipidowych, wpływając na ich ilość i sposób rozmieszczenia w tkance łącznej i sarkoplazmie.

Zawartość tłuszczu oznaczona za pomocą komputerowej analizy obrazu koreluje z ilością tłuszczu oznaczonego metodami chemicznymi [10]. Jak pokazano na załączonych fotografiach, w mięśniach piersiowych kurcząt, przy najniższym dodatku (2,75%) oleju rzepakowego i tokoferolu do paszy, liczba kropeł tłuszczu była proporcjonalna do oznaczonej zawartości tłuszczu w mięśniach na poziomie 2,6%, a struktura kuleczek była niezmienną. W mięśniach udowych, podobnie jak w mięśniach piersiowych, koncentracja kuleczek tłuszczowych była również proporcjonalna do ilości oznaczonego tłuszczu w mięśniach ciemnych.

Różny system żywienia kurcząt wywarł mniejszy wpływ na obraz ilościowy kropeł lipidowych obecnych we włóknach, natomiast wyraźny był efekt ilościowy we frakcji lipidowej, występującej w tkance łącznej.

Wzrastający dodatek oleju rzepakowego do paszy spowodował wzrost wielkości kropeł lipidowych. Najwyższy dodatek (8,25%) oleju do paszy wskazywał również na dużą zmienność kształtu kropeł w tkance łącznej. Zniszczone struktury kropeł lipidowych były obserwowane zarówno w mięśniach piersiowych, jak i udowych, aczkolwiek w tych ostatnich w większym stopniu. Zniszczone krople lipidowe tworzyły formy rozlane, tzw. nacieki, zlokalizowane w przestrzeniach międzykomórkowych oraz

między pęczkami włókien. Zwiększanie ilości dodanego oleju rzepakowego do paszy prowadziło do wzrostu ilości kropeł lipidowych w tkance łącznej i we włóknach mięśniowych. Konsekwencją tego był rozpad powiększających się kropeł tłuszczu na mniejsze, lub rozpad zupełny, w wyniku czego powstały nieustrukturyowane skupiska lipidowe wyżej nazwane naciekami. Obecność tego typu struktur lipidowych może nieść ze sobą wiele konsekwencji, na przykład większą podatność lipidów mięsa na procesy utleniania i gromadzenia się produktów utleniania, m.in. cholesterolu, co wykazano w badaniach Malczyk [11].

Uogólniając efekty zmiennej diety żywieniowej można stwierdzić, że dodatek tłuszczów roślinnych, a szczególnie ich rodzaj i poziom w diecie kurcząt, wpływają na ilość i jakość kropeł tłuszczowych obecnych w tkance łącznej, jak i w nieco mniejszym stopniu w sarkoplazmie mięśni piersiowych i udowych. Z kolei ilość i jakość kropeł tłuszczowych w tkance łącznej i sarkoplazmie ma związek z podwyższeniem zawartości lipidów i przyspieszeniem procesów utleniania lipidów zawartych w mięsie.

Praca wykonana w ramach grantu KBN 5P06G00612

LITERATURA

- [1] Burck H.: Technika histologiczna. PZWL, Warszawa 1975.
- [2] Grabowski T.: Surowiec do produkcji mięsa drobiowego (cz. II). Polskie Drobiarstwo, **10**, 1993, 16.
- [3] Hoogenkamp H.W.: Innovative geformte Hühnerfleischprodukte. Fleischwirtschaft, **78**, 1998, 190.
- [4] Kassner J., Kuryszko J.: Some problems of the morphometric analysis of the mouseocytes. Zoologica, **27**, 1980, 46.
- [5] Kolanowski W., Świdorski F.: Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z grupy n-3 (n-3 PUFA). Korzystne działanie zdrowotne, zalecenia spożycia, wzbogacanie żywności. Żyw. Człow. i Met., **24**, 1997, 49.
- [6] Konwiński M., Szymkowiak W.: Zastosowanie stereologii w badaniach morfometrycznych. Postępy Biologii Komórki, **1**, 1975, 1.
- [7] Kulasek G., Krasicka B., Świerczewska E.: Jaja i tuszki drobiowe wzbogacone w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe – nowe kierunki produkcji drobiarskiej. Drobiarstwo, **5**, 1996, 5.
- [8] López-Ferrer S., Baucells M.D., Barroeta A.C., Grashorn M.A.: n-3 enrichment of chicken meat using fish oil: alternative substitution with rapeseed and linseed oils. Poultry Sci., **78**, 1999, 356.
- [9] Malczyk E.: Wpływ systemu żywienia kurcząt na procesy oksydacyjne zachodzące w mięsie przechowywanym chłodniczo. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, **3 (20) Supl.**, 1999, 136.
- [10] Malczyk E.: Ocena cech jakościowych tuszek i mięsa kurcząt brojlerów żywionych paszą wzbogaconą w oleje roślinne i alfa-tokoferol. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu 2001 (w druku).
- [11] Malczyk E.: Wpływ paszy z dodatkami olejów roślinnych i alfa-tokoferolu na zmiany oksydacyjne tłuszczu oraz właściwości sensoryczne mięsa kurcząt. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, **3, (28)**, 2001, 32.

- [12] Malczyk E., Kopeć W., Smolińska T.: Influence of oil and vitamin E (alfa-tokopherol) supplementation on lipid oxidation and flavour poultry meat. Proceed. 14th Europ. Symp. Quality of Poultry Meat, Bologna, 1999, 167.
- [13] Melton S.L.: Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. Food Technol., 6, 1993, 105.
- [14] Mossab A., Lessire M., Hallouis J.M., Hermier D.: Using dietary fats to improve polyunsaturated fatty acid content of poultry meat. Proceed. 14th Europ. Symp. Quality Poultry Meat. Bologna, 1999, 159.
- [15] Pikul J.: Korzyści stosowania pasz dla drobiu wzbogaconych w tokoferole. Gosp. Mięś., 3, 1997, 48.
- [16] Sheehy P.J.A., Morrissey P.A., Buckley D.J.: Advances in research and application of vitamin E as an antioxidant for poultry meat. Proceed. 12th Europ. Symp. Quality Poultry Meat. Zaragoza 1995, 425.
- [17] Smolińska T., Popiel A., Malczyk E.: Influence of dietary supplement with PUFA and antioxidant on oxidative processes of fats and sensorical changes of broiler chicken meat. Proceed. 10th Europ. Poultry Conf., Jerusalem 1998, 2.
- [18] Świerczewska E., Niemiec J.: The levels of cholesterol and lipids in the liver and muscles of 7 week old males and females fed the feed containing rapeseed „00”. Proceed. 12th Europ. Symp. Quality Poultry Meat. Zaragoza, 1995, 447.
- [19] Zawistowski S.: Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii. PZWL, Warszawa 1983.

HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF LIPIDS OF LIGHT AND DARK MUSCLES OF CHICKEN FED WITH FODDER ENRICHED WITH PLANT OILS AND ALFA-TOCOPHEROL

S u m m a r y

The microscopic examination of lipid droplets in the muscles of chicken (hybrids of Vedetta line) was conducted. The section of superficial breast muscle (*Musculus pectoralis thoracica*) and thigh muscle (*Musculus iliotibialis*) were prepared for histochemical analysis. The microstructure analysis concerned quantity, size, and shape form of lipid droplets and their occurrence in the sarcoplasm and connective tissue. The computer analysis of microscopic images was conducted. The influence of rape oil, flaxseeds and α -tocopherol additions to the fodder of chicken on the size and manner of lipid droplets distribution in the sarcoplasm and connective tissue was stated. ❖