



POLSKIE TOWARZYSTWO
TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
WYDAWCA ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI



ŻYWNOŚĆ

NAUKA • TECHNOLOGIA • JAKOŚĆ

Suplement

Nr 3(20)

Kraków 1999

Rok 6

ŻYWNOŚĆ

Kwartalnik naukowy

Nr 3(20)Supl.

Kraków 1999

Rok 6

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: AGRO-LIBREX, Chemical Abstracts Service i IFIS



**POLSKIE TOWARZYSTWO
TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
WYDAWCA ODDZIAŁ MAŁOPOLSKI**



ŻYWNOŚĆ

NAUKA • TECHNOLOGIA • JAKOŚĆ

Suplement

Nr 3(20)

Kraków 1999

Rok 6

REDAKCJA:

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax 012/ 4213834

Sekretarz redakcji: dr inż. Anna Bala-Piasek; tel. 012/ 411-91-44 w. 293;

e-mail: rрпиasek@cyf-kr.edu.pl

Redaktorzy: prof. dr hab. Bohdan Achremowicz, prof. dr hab. Mieczysław Pałasiński, dr inż. Jerzy Pałasiński, dr Teresa Woźniakiewicz

Stali współpracownicy: prof. dr hab. Jacek Kijowski (Poznań), dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (Warszawa), dr Grażyna Morkis (Warszawa), doc. dr hab. Maria Soral-Śmietana (Olsztyn)

RADA PROGRAMOWA:

prof. dr Antoni Rutkowski (*przewodniczący*), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (*sekretarz*), prof. dr hab. Zbigniew Duda, prof. dr hab. Józef Fornal, prof. dr hab. Roman Grzybowski, prof. dr hab. Mieczysław Jankiewicz, prof. dr hab. Jan Kisza, prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Helena Oberman, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, prof. dr hab. Tadeusz Tuszyński, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz

WYDAWCA:

POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI

Oddział Małopolski

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 1999

Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1425-6959

ADRES REDAKCJI:

31-425 KRAKÓW, AL. 29 LISTOPADA 46

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków

tel./fax (012) 266-92-69

SPIS TREŚCI

Od redakcji.....	5
EWA MRÓWKA, JOANNA ROZMIERSKA, ANTONINA KOMOROWSKA, KRYSTYNA STECKA	
Właściwości funkcjonalne wybranych preparatów pochodzenia drożdżowego.....	7
JOANNA CHMIELEWSKA, JOANNA KAWA-RYGIELSKA	
Zróżnicowanie genetyczne szczepów drożdży fermentujących ksylozę.....	17
ALINA KRYSTYNOWICZ, WOJCIECH CZAJA, STANISŁAW BIELECKI	
Biosynteza i możliwości wykorzystania celulozy bakteryjnej	22
WOJCIECH CZUB, MARIANNA TURKIEWICZ	
Biosynteza skleroglukanu przez szczep <i>Sclerotium sp.</i>	35
MAREK PRIMIK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ, WANDA DUSZKIEWICZ-REINHARD	
Otrzymywanie haploidalnych form piwowarskich szczepów drożdży	44
AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ TRZMIEL	
Immobilizacja subtilizyn z trzech gatunków bakterii: <i>B. bacillus: subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> i <i>B. alcalophilus</i>	50
AGNIESZKA MAJ, DANUTA WITKOWSKA	
Badania nad degradacją β -glukanów przy udziale pozakomórkowych hydrolaz grzybów <i>Trichoderma</i>	59
JOANNA KAWA-RYGIELSKA	
Zastosowanie metody PCR do różnicowania drożdży przemysłowych	69
MARTA PASŁAWSKA	
Stan fizjologiczny unieruchomionych komórek drożdży w czasie fermentacji etanolowej.....	76
DAGMARA MIERZEJEWSKA, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI	
Produkcja, charakterystyka i zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w analizie laboratoryjnej.....	82
ANETA WIDERA	
Charakterystyka jakościowa skrobi i właściwości reologicznych ciasta z mąki różnych odmian jęczmienia jarego	96
RAFAŁ WOŁOSIAK, ELWIRA WOROBIJ	
Aktywność antyoksydacyjna izolatu i hydrolizatów białek grochu	105

ADRIANNA MIKOŁAJCZAK, BEATA DRUŻYŃSKA	
Antyoksydacyjne właściwości polifenoli okrywy nasiennych fasoli kolorowej	112
STANISŁAW KALISZ	
Wykorzystanie związków fenolowych z tarczycy bajkalskiej (<i>Scutellaria bajkalensis</i>) w stabilizacji win aroniowych	118
EWA MAJEWSKA	
Wykorzystanie konduktometrii do określenia zawartości składników mineralnych w miodzie	129
EWA MALCZYK	
Wpływ systemu żywienia kurcząt na procesy oksydacyjne zachodzące w mięsie przechowywanym chłodniczo	136
MACIEJ OZIEMBŁOWSKI	
Parametry analizy termomechanicznej na przykładzie badań masy jajowej	151
MACIEJ WOJTCZAK, BOGUSŁAW KRÓL	
Zmienność zawartości wybranych zanieczyszczeń cukru białego w czasie trwania kampanii 1998/99	160
IWONA KIHMBERG	
Szwedzki interdyscyplinarny program naukowy „Żywność 21”	169
EWA MRÓWKA	
Nowoczesne metody eksperymentalne w badaniach żywności, Rynia n. Zalewem Żegrzyńskim 31.05 – 02.06.1999	177
Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji PTTŻ	179
Informacja dla autorów	180

OD REDAKCJI

Szanowni Państwo,

otrzymujecie Suplement nr 3(20) kwartalnika „Żywność”, w którym publikujemy artykuły będące pokłosiem IV Sesji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ nt.: „Nowoczesne metody eksperymentalne w badaniach żywności”, która odbyła się w Ryni w dniach 31.05–2.06.1999 r.

Wyrażam nadzieję, że zamieszczone w tym Suplemencie artykuły zostaną przyjęte z zainteresowaniem przez naszych Czytelników.

Kraków, wrzesień 1999 r.

Redaktor Naczelny

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, positioned below the title 'Redaktor Naczelny'.

Tadeusz Sikora

EWA MRÓWKA, JOANNA ROZMIERSKA, ANTONINA KOMOROWSKA,
KRYSTYNA STECKA

WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE WYBRANYCH PREPARATÓW POCHODZENIA DROŹDŻOWEGO

Streszczenie

W pracy oceniono następujące właściwości funkcjonalne: rozpuszczalność, zdolność wiązania tłuszczu, zdolność emulgującą oraz zdolności pianotwórcze następujących preparatów pochodzenia drożdżowego: dwu ekstraktów drożdżowych, koncentratu i hydrolizatu białka drożdżowego.

Oba ekstrakty i hydrolizat charakteryzowały się dobrą rozpuszczalnością w zakresie pH 2–10, rozpuszczalność koncentratu malała w pobliżu punktu izoelektrycznego, przy wartości pH = 4. Ekstrakty drożdżowe charakteryzowały się ponadto zdolnością wiązania tłuszczu FBC = 60% i 80%, zdolnością tworzenia piany FC = 300% i 500% oraz brakiem zdolności emulgujących. Koncentrat białka drożdżowego charakteryzował się zdolnością wiązania tłuszczu FBC = 170%, zdolnością tworzenia piany, FC = 700%, wysoką trwałością utworzonej piany oraz zdolnością emulgującą EC = 82%. Wartości oznaczeń własności funkcjonalnych hydrolizatu wynosiły odpowiednio EC = 70%, FBC = 72% i FC = 600%.

Dobra rozpuszczalność uzyskanych preparatów drożdżowych i cechy funkcjonalne wskazują na możliwość ich zastosowania w produkcji spożywczej.

Wstęp

Preparaty pochodzenia drożdżowego wykorzystywane są w produkcji żywności głównie jako środki smakowo-zapachowe. Preparaty te charakteryzują się wysoką zawartością białka o korzystnym żywieniowo składzie aminokwasowym. W latach 70., poszukując nowych źródeł białka, prowadzono prace nad otrzymywaniem izolatów białka drożdżowego [13]. Opracowane preparaty białkowe, mimo wielu zalet i umiarkowanej ceny, nie znalazły szerokiego zastosowania.

Przyczyniły się do tego informacje o niekorzystnych skutkach zdrowotnych spowodowanych spożywaniem kwasów nukleinowych zawartych w preparatach drożdżo-

wych w ilościach ponad 2 g na dobę (przy przeciętnej zawartości kwasów nukleinowych rzędu 10% jest to równoważne spożyciu ok. 20 g preparatu).

Obserwowany w ostatnich latach wzrost zapotrzebowania na dodatki do żywności stwarza nowe możliwości wykorzystania preparatów pochodzenia drożdżowego, a traktowanie ich jako dodatku, a nie jako alternatywnego źródła białka, i spożywanie w ograniczonej ilości nie stwarza zagrożenia dla zdrowia (bezpieczna dawka kwasów nukleinowych nie zostaje przekroczona). Preparaty białkowe pochodzenia drożdżowego mogą stanowić cenny składnik wyrobów spożywczych, przede wszystkim preparatów dietetycznych, ze względu na zawartość witamin oraz na korzystny skład aminokwasowy, zbliżony do składu białka jaja kurzego. Dodatek preparatów drożdżowych stwarza możliwości uzyskania nowych, atrakcyjnych produktów żywnościowych o wysokich walorach odżywczych. Dotyczy to takich grup żywności, jak żywność wygodna, koncentraty spożywcze, różnego rodzaju sosy sałatkowe, przekąski, żywność częściowo przetworzona, wyroby wegetariańskie, nowe gatunki produktów spożywczych, wędliny i przetwory mleczne itd.

Preparaty drożdżowe, zależnie od sposobu wytwarzania, charakteryzują się różnymi cechami smakowo-zapachowymi względnie neutralnością smakową. I tak ekstrakty drożdżowe, otrzymane w procesie autolizy, mają aromat mięsny, grzybowy lub bulionowy. Natomiast koncentraty, izolaty lub otrzymane w odpowiednich warunkach hydrolizaty białka drożdżowego pozbawione są smaku i zapachu. Profil smakowo-zapachowy preparatu drożdżowego w sposób zasadniczy determinuje możliwość zastosowania go w konkretnym produkcie spożywczym.

Podstawową właściwością funkcjonalną, decydującą o wykorzystaniu przemysłowym danego produktu drożdżowego, jest jego rozpuszczalność. Preparaty pochodzenia drożdżowego charakteryzujące się dobrą rozpuszczalnością, mogą znaleźć zastosowanie w produkcji koncentratów zup, sosów i napojów, zaś jeśli posiadają zdolności pianotwórcze, a są smakowo neutralne, można je użyć w produkcji ciast, bez, deserów, biszkoptów. Te preparaty, które charakteryzują się dobrymi właściwościami emulgującymi i zdolnością wiązania tłuszczu zastosować można w produkcji wędlin, koncentratów spożywczych, majonezów, ciast, pieczywa, itp. [3, 5, 7, 10].

Produkty pochodzenia drożdżowego otrzymywane różnymi metodami charakteryzują się odmiennymi właściwościami funkcjonalnymi. W celu oceny przydatności preparatu drożdżowego do wybranych celów przetwórczych konieczne jest określenie tych właściwości, obok znajomości ich walorów odżywczych i charakterystyki smakowo-zapachowej.

Celem pracy było określenie wybranych właściwości funkcjonalnych: rozpuszczalności, zdolności aeracyjnych: zdolności pianotwórczych, oraz zdolności hydrofobowych: zdolności wiązania tłuszczu i zdolności emulgujących preparatów drożdżowych: dwu ekstraktów drożdżowych, koncentratu i hydrolizatu białka drożdżowego.

Materiały i metody badań

Materiałem do badań były preparaty otrzymane z drożdży piekarskich szczepu KKP/518 (Mazowiecka Wytwórnia Wódek i Drożdży w Józefowie) w Zakładzie Technologii Spirytusu i Drożdży Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie.

Ekstrakty drożdżowe uzyskano w wyniku indukowanej autolizy komórek drożdży piekarskich (50°C, 24 h). Jako induktory autolizy stosowano induktor mieszany: glukozę, etanol i NaCl (0,5/1,0/2,5% w/w) – otrzymano ekstrakt **E1**; oraz kwas adypinowy 0,5% w/w – otrzymano ekstrakt **E2**. Po zakończeniu autolizy zawiesiny wirowano celem oddzielenia ścian komórkowych, a supernatanty nazywane dalej ekstraktami drożdżowymi suszono rozpyłowo.

Koncentrat białka drożdżowego **K** otrzymano na drodze dwustopniowej ekstrakcji alkalicznej biomasy drożdży i precypitacji w punkcie izoelektrycznym, przy wartości pH=4,4. Hydrolizat białka drożdżowego **H** uzyskano przy użyciu enzymu Flavourzyme, Novo Nordisk (5h, pH:7, temperatura 50°C, E/S:2/100). Preparaty koncentratu **K** i hydrolizatu **H** wysuszono rozpyłowo. Oceniono skład chemiczny otrzymanych preparatów, zawartość białka metodą Kjeldahla [9], cukrów ogółem metodą Dubois [1] i kwasów nukleinowych metodą Munro i wsp. [8].

Właściwości funkcjonalne ww. preparatów oceniano metodami:

rozpuszczalność – według Krolla [6] w modyfikacji własnej. Mierzono spektrofotometrycznie ($\lambda = 500$ nm) zmętnienie 1% roztworów o wartościach pH od 2 do 9. Na podstawie pomiarów wybierano roztwór o największym zmętnieniu i po odwirowaniu oznaczano w supernatancie zawartość rozpuszczalnych związków azotowych metodą Kjeldahla. Porównawczo oznaczano zawartość azotu w próbce wyjściowej. Wskaźnik rozpuszczalności obliczano ze wzoru:

$$NSI(\%) = N_{pH=x} / N_0 \times 100\%$$

$N_{pH=x}$ – zawartość azotu w próbce o największej absorbancji,

N_0 – zawartość azotu w próbce wyjściowej;

zdolność wiązania tłuszczu (FBC) według Schwenke i wsp. [11];

zdolności pianotwórcze (FC, FS) według Jędrzejczyk [4];

zdolność emulgowania (EC) metodą Swifta i wsp. [12] w modyfikacji Grabowskiej i wsp. [2].

Porównawczo oceniono wybrane właściwości funkcjonalne preparatów handlowych: lecytyny instant firmy Stern, koncentratu białka sojowego Arcon firmy Vit-Pol oraz drożdży autolizowanych. Wartości podane w tabelach stanowią średnią wyników uzyskanych w trzech równoległych oznaczeniach.

Wyniki i dyskusja

Wysuszone ekstrakty drożdżowe E1 i E2 charakteryzowały się smakiem i zapachem bulionowo-grzybowym i barwą jasnożółtą, koncentrat K i hydrolizat H miały neutralny smaki zapach i barwę kremową. Zgodnie z deklaracją producenta użytego enzymu otrzymany hydrolizat nie miał smaku gorzkiego. W otrzymanych preparatach oceniono zawartość białka, cukrów ogółem i kwasów nukleinowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Zawartość białka, cukrów ogółem i kwasów nukleinowych w ekstraktach drożdżowych E1 i E2, koncentracie białkowym K i hydrolizacie H.

The content of protein, sugar and nucleic acids in yeast extracts: E1, E2, concentrate K, and hydrolyzate H.

Preparat Preparation	Zawartość, (%) / content of (%)		
	białka / protein	cukrów / sugar	kwasów nukleinowych / nucleic acids
E1	56,6	14,9	8,9
E2	60,5	10,1	10,8
K	75,6	7,9	8,0
H	73,2	7,2	7,3

Ekstrakty (E1 i E2) otrzymane metoda indukowanej autolizy biomasy drożdży charakteryzowały się zawartością białka, oznaczonego metodą Kjeldahla do 60% i cukrów ogółem od 8,9 do 10,8%. Koncentrat białkowy K i hydrolizat H zawierały ok. 75% białka i 7 – 8% cukrów ogółem. Zawartość kwasów nukleinowych we wszystkich otrzymanych preparatach była zbliżona i wynosiła od ok. 7% dla hydrolizatu do ponad 10% dla ekstraktu E2.

Rozpuszczalność

Podstawową właściwością funkcjonalną, determinującą technologiczne możliwości zastosowania preparatów drożdżowych jest rozpuszczalność. Oceniono rozpuszczalność otrzymanych preparatów ekstraktów (E1 i E2), koncentratu (K) i hydrolizatu białka drożdżowego (H). Krzywe rozpuszczalności na rysunkach 1 i 2 przedstawiają zależność absorbancji, w ustalonych warunkach pomiarowych, od wartości pH roztworu preparatu drożdżowego. Nie stwierdzono gwałtownego wzrostu zmętnienia w badanym zakresie wartości pH w obu ekstraktach i hydrolizacie, co wskazuje na dobrą rozpuszczalność preparatów. Z tego powodu w tych preparatach nie oznaczano wskaźnika rozpuszczalności NSI. Koncentrat K wykazywał najwyższe zmętnienie, a w konse-

kwencji, najniższą rozpuszczalność przy wartości pH 4. W tym punkcie wskaźnik rozpuszczalności NSI wyniósł 16%.

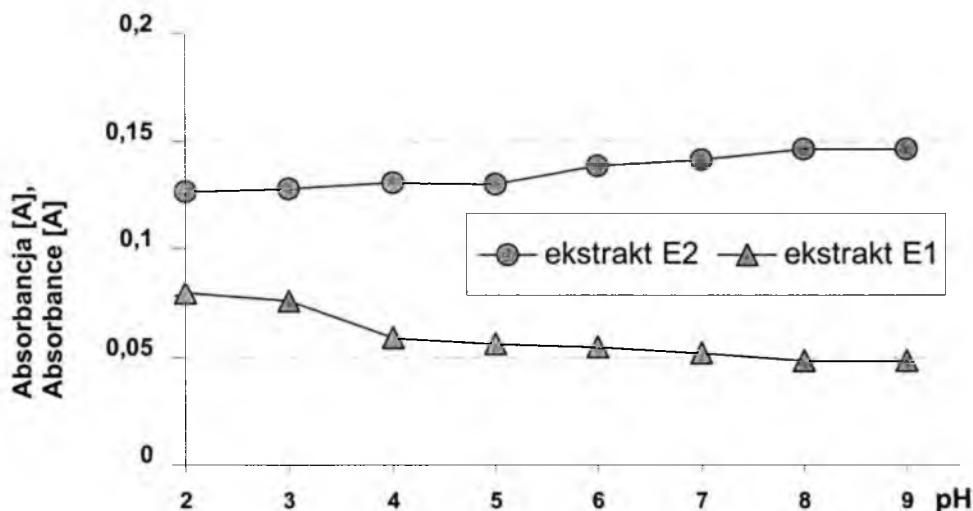
Właściwości aeracyjne

Oceniono właściwości aeracyjne: zdolność tworzenia piany (FC) i stabilność otrzymanej piany (FS) po czasie 30 min., a wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

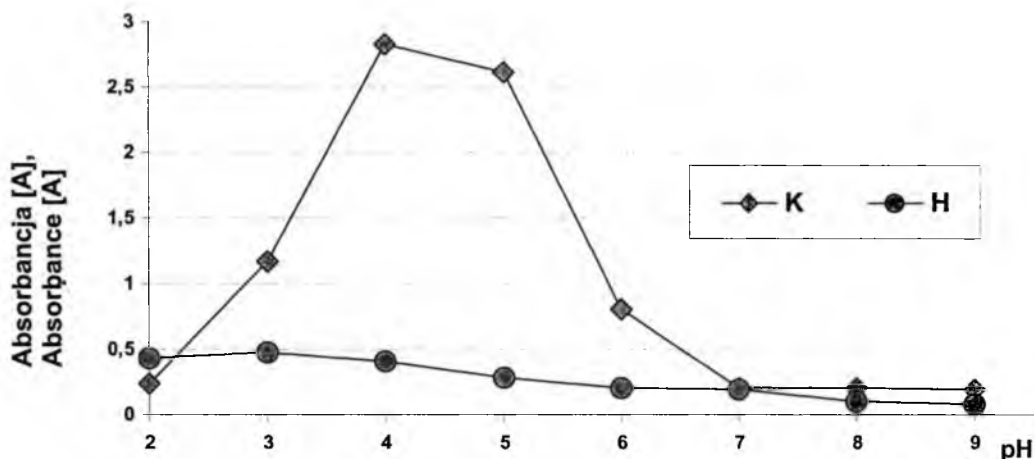
Zdolność tworzenia piany (FC) i stabilność piany (FS) preparatów drożdżowych.
Foaming capacity (FC), and foam stability (FS) of selected yeast products.

Preparat / Preparation	Zdolność tworzenia piany, foaming capacity, FC [%]	Stabilność piany, foam stability, FS [%]
E1	300	0
E2	500	0
K	850	90
H	600	16



Rys. 1. Rozpuszczalność ekstraktów.

Fig. 1. Solubility of the yeast extracts.



Rys. 2. Rozpuszczalność koncentratu K i hydrolizatu H.

Fig. 2. Solubility of the concentrate K and hydrolyzate H.

Poszczególne wartości oznaczenia FC odbiegały od wartości średniej maksymalnie o 22 %, zaś oznaczenia FS maksymalnie o 2%. Brak stabilności piany w obu ekstraktach może być spowodowany obecnością tłuszczów w ilości ok. 2% (wynik badań własnych). Koncentrat i hydrolizat białka drożdży zawierały poniżej 1% tłuszczów, redukcja ich zawartości wynika z metody izolacji białka, gdzie w wyniku stosowanych alkaliów tłuszcze ulegają zmydleniu i częściowemu oddzieleniu.

Hydrolizat białka drożdży charakteryzował się niższymi wartościami FC i FS niż koncentrat. Powodem tego może być skrócenie łańcuchów białkowych do rozmiarów niedostatecznie stabilizujących powstającą pianę.

Właściwości hydrofobowe

W wielu potencjalnych kierunkach zastosowań istotne są interakcje preparatu z tłuszczami. Oceniono własności hydrofobowe preparatów drożdżowych: zdolności emulgowania i zdolność wiązania tłuszczu. Celem porównania oznaczono ww. właściwości preparatów handlowych: koncentratu białka sojowego, lecytyny sojowej i drożdży autolizowanych. Wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Poszczególne oznaczenia FBC odbiegały od wartości średniej maksymalnie o 5%, zaś oznaczenia EC maksymalnie o 6%.

W przypadku obu ekstraktów pomiar zdolności emulgowania wybraną metodą nie pozwolił na uzyskanie jednoznacznych wyników. Podczas pomiaru preparaty te wizualnie dyspergowywały olej, lecz wartości pomiaru oporu były znacznie wyższe niż dla pozostałych tworzonych emulsji. Nie udało się również wyznaczyć punktu załamania

emulsji, charakteryzującego się nagłym wzrostem oporu. Może to wskazywać na odmienne cechy fizykochemiczne białka ekstraktów, jak również na niedostosowanie metody pomiaru zdolności emulgowania do tej grupy preparatów. Będzie to przedmiotem dalszych badań z wykorzystaniem innych metod oceny właściwości emulgujących, jak również badań fizykochemicznych białek drożdżowych (np. ich elektroforezy).

Koncentrat i hydrolizat drożdżowy miały wyraźnie lepsze właściwości emulgowania niż porównywane preparaty handlowe, natomiast zdolność wiązania tłuszczu była zbliżona.

Tabela 3

Właściwości hydrofobowe preparatów drożdżowych i preparatów handlowych.

Hydrophobic properties of selected yeast products and commercial preparations.

Preparat / Preparation	Zdolność emulgowania, Emulsion capacity, EC [cm ³ oleju/g]	Zdolność wiązania tłuszczu, Fat binding capacity, FBC [%]
E1	nie oznaczona	88
E2	nie oznaczona	76
K	820	118
H	700	72
drożdże autolizowane	95	120
białko sojowe	170	96
lecycyna sojowa	470	105

Podsumowanie

Rozpuszczalność jest ważną właściwością funkcjonalną preparatów białkowych, decydującą o ich wykorzystaniu w przetwórstwie spożywczym. Ekstrakty drożdżowe E1 i E2, otrzymane w wyniku autolizy drożdży, charakteryzowały się dobrą rozpuszczalnością w całym badanym zakresie pH. Rozpuszczalność koncentratu K malała w pobliżu punktu izoelektrycznego (przy wartości pH = 4). Hydroliza enzymatyczna białka drożdżowego poprawiła jego rozpuszczalność z zakresie niskich wartości pH, hydrolizat H charakteryzował się dobrą rozpuszczalnością. Niska rozpuszczalność koncentratu w zakresie pH 4–5 limituje jego wykorzystanie w produktach płynnych o takiej kwasowości.

Ekstrakty drożdżowe E1 i E2 charakteryzowały się smakiem i zapachem bulionowo-grzybowym, co stwierdzono w innych badaniach, zdolnością tworzenia piany FC = 300% i 500%, natomiast wytworzona piana nie wykazywała stabilności. Taka

charakterystyka stwarza możliwość wykorzystania ekstraktów drożdżowych w produktach płynnych typu sosy lub soki warzywne, gdzie pienienie się może być także przeszkodą w procesie wytwórczym.

Koncentrat białka drożdżowego K charakteryzował się w przeciwieństwie do ekstraktów neutralnym smakiem i zapachem; miał on wyjątkowo wysoką zdolność tworzenia piany $FC = 800\%$, przy jednoczesnej wysokiej trwałości utworzonej piany $FS = 90\%$. Posiadał również wyjątkowo wysoką zdolność emulgującą $EC = 820$ [cm^3 oleju/g]. Koncentrat białka drożdżowego K, posiadający dobre właściwości emulgujące i pianotwórcze, może znaleźć zastosowanie w produkcji pulchnych farszów, deserów, wyrobów piekarskich, majonezów i dań gotowych.

Właściwości aeracyjne hydrolizatu H wynosiły: zdolność tworzenia piany $FC = 600\%$ i stabilność piany $FS = 16\%$. Zdolności emulgujące hydrolizatu ($EC = 700$ [cm^3 oleju/g]) były nieco niższe niż zdolności emulgujące koncentratu, lecz prawie dwukrotnie wyższe niż lecytyny "Stern" i czterokrotnie wyższe niż koncentratu białka sojowego, handlowego dodatku do wędlin.

Wszystkie oceniane preparaty pochodzenia drożdżowego charakteryzowały się podobną zdolnością wiązania tłuszczu, porównywalną do zdolności wiązania tłuszczu koncentratu białka sojowego.

Wysuszone rozpyłowo preparaty koncentratu i hydrolizatu białka drożdżowego charakteryzowały się barwą kremową, dzięki czemu dodane do produktu spożywczego nie spowodują zmiany jego barwy.

Intensywna hydroliza białek drożdżowych doprowadzić może do uwolnienia gorzkich peptydów, ograniczając możliwości wykorzystania hydrolizatów w produkcji spożywczej. Użycie preparatu enzymatycznego, który według informacji producenta nie powoduje tworzenia gorzkich peptydów, umożliwiło otrzymanie dobrze rozpuszczalnego hydrolizatu pozbawionego goryczy.

Przedstawione wyniki mają charakter pilotażowy, ich celem było orientacyjne określenie właściwości preparatów pochodzenia drożdżowego, otrzymanych różnymi metodami w Zakładzie Technologii Spirytusu i Drożdży IBPRS w Warszawie. Weryfikacja przydatności preparatów drożdżowych w konkretnym wyrobie spożywczym nastąpić może po zastosowaniu preparatu w odpowiednim układzie modelowym, gdzie można prześledzić cały kompleks właściwości funkcjonalnych w interakcji z podstawowymi składnikami określonego produktu. Oczywiście o jego ostatecznym wykorzystaniu zadecyduje również rachunek ekonomiczny.

Wnioski

1. Ekstrakty drożdżowe E1 i E2 oraz hydrolizat białka drożdżowego H otrzymane w Zakładzie Technologii Spirytusu i Drożdży charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością. Parametr ten i wybrane właściwości funkcjonalne wskazują na możliwość

- zastosowania tych preparatów w produkcji koncentratów oraz płynnych wyrobów spożywczych, sosów, zup itd.
2. Koncentrat K i hydrolizat białka drożdży H charakteryzuje się lepszymi zdolnościami emulgującymi niż handlowe białko sojowe Arcon firmy Vit-Pol i lecytyna sojowa instant firmy Stern. Preparaty te posiadają dobrą zdolność wiązania tłuszczu, dzięki czemu mogą stanowić dodatek do wędlin, wyrobów garmażeryjnych, dań gotowych, deserów itd.
 3. Słabe zdolności pianotwórcze ekstraktów drożdżowych stwarzają możliwość ich wykorzystania w produkcji napojów, np. soków warzywnych, sosów, zup lub płynnych dań wegetariańskich.

LITERATURA

- [1] Dubois M., Gillet K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 1956, 350.
- [2] Grabowska J., Naczek M., Sikorski Z.E.: Wymierna charakterystyka zdolności emulgującej białek stosowanych jako dodatki do wędlin, *Przem. Spoż.*, **24**, 1972, 20-22.
- [3] Gwiazda S., Rutkowski A.: Rozwój metod badania właściwości fizykochemicznych preparatów białkowych, *Przem. Spoż.*, **32** (1), 1978, 8-12.
- [4] Jędrzejczyk H.: Właściwości zagęszczające i pianotwórcze hydrokolidów i emulgatorów spożywczych, w: "Technologia Przemysłowej Produkcji Potraw", red. Świdorski F., WNT, Warszawa, 1989, 55.
- [5] Komorowska A., Stecka K.: Białka i hydrolizaty do celów spożywczych - moda czy potrzeba chwili?, *Przem. Spoż.*, **3**, 1998, 26-28.
- [6] Kroll J.: Methode zur Bestimmung des Stickstoffloslichkeitsprofils von Proteinpreparaten Nahrung, **29**, 10, 1985, 1029-1030.
- [7] Leman J.: Struktura białka i jego własności funkcjonalne, *Przem. Spoż.*, **42** (10), 1988, 285-288.
- [8] Munro H., Fleck A.: The determination of nucleic acids, *Methods of Biochemical Analysis*, 1966, 53-54.
- [9] PN - 75/A - 04018. Oznaczenie azotu metodą Kjeldahla w przeliczeniu na białko.
- [10] Scharf U., Schlingmann M., von Rymon Lipinski G.: Functional protein hydrolyzates, a process for their preparation, use of these protein hydrolyzates as a food additive, and foods containing these protein hydrolyzates, US Patent nr 4, 627, 983; 1986.
- [11] Schwenke K.D., Prah L., Rauschal E., Gwiazda S., Dąbrowski K., Rutkowski A.: Functional properties of plant proteins, *Nahrung*, **25** (1), 1981, 59.
- [12] Swift C.E., Lockett C., Fryar A.J.: Comminuted Meat Emulsion - The Capacity of Meats for Emulsifying Fat, *Food Technol.*, **15**, 1961, 468-473.
- [13] Vananuvat P., Kinsella J.E.: Some functional properties of protein isolates from yeast *Saccharomyces fragilis*, *J. Agric. Food Chem.*, **23** (4), 1975, 613.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF SELECTED YEAST PRODUCTS

S u m m a r y

The functional properties: solubility, fat binding capacity, emulsion capacity and foaming properties of selected yeast products: yeast extracts, yeast protein isolate and hydrolyzate were investigated.

Yeast extracts and yeast protein hydrolyzate had a good solubility in the pH range 2–9. The solubility of the yeast protein concentrate decreased at the isoelectric point (pH 4).

The fat binding capacity FBC of the two yeast extracts was 60% and 80% respectively, and the foam capacity, FC was 300% and 500%. No emulsion capacity was found for the extracts. The yeast protein isolate has a good fat binding capacity FBC = 170%, foaming capacity FC = 700% and emulsion capacity EC = 82%. The functional properties of yeast protein hydrolyzates were: fat binding capacity FBC = 72%, foaming capacity FC = 600% and emulsion capacity EC = 70%. The good solubility and the functional properties of the selected yeast products show that they can be used in the food industry. ☒

JOANNA CHMIELEWSKA, JOANNA KAWA-RYGIELSKA

ZRÓŻNICOWANIE GENETYCZNE SZCZEPÓW DROŹDŹY FERMENTUJĄCYCH KSYŁOŻĘ

S t r e s z c z e n i e

W pracy podjęto próbę wykorzystania metody PCR do różnicowania gatunków drożdży fermentujących ksyłożę: *Pichia stipitis*, *Yamadazyma stipitis*, *Candida shehatae* i *Pachysolen tannophilus*.

Wstęp

Rozwój w dziedzinie biologii molekularnej stworzył możliwość wykorzystania w diagnostyce drobnoustrojów metod opartych na analizie DNA lub RNA, w tym polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR – polimerase chain reaction). Metoda ta polega na enzymatycznej amplifikacji wybranego odcinka DNA przez polimerazę DNA przy użyciu swoistych starterów inicjujących syntezę nowej nici DNA na matrycy wyjściowej. W efekcie uzyskuje się zwielowrotnioną liczbę kopii materiału genetycznego.

Celem pracy był dobór primerów różnicujących gatunki drożdży fermentujące ksyłożę.

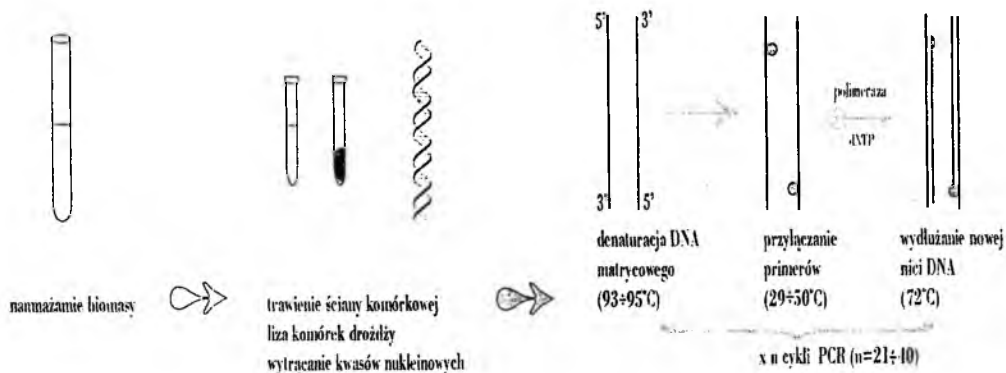
Materialy i metody badań

Materiał biologiczny stanowiły drożdże *Pichia stipitis* (1), *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, *Pichia stipitis* (2), *Candida shehatae* ATCC 58779, *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 oraz *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392.

Izolację całkowitego DNA z komórek drożdży prowadzono zmodyfikowaną metodą Rose i wsp. [5], z wykorzystaniem Zymolazy 5000 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd) o stężeniu 20 mg/cm³. Do powielania DNA zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) w termocyklerze PTC-200 DNA Engine firmy MJ Research, INC., przy użyciu primerów:

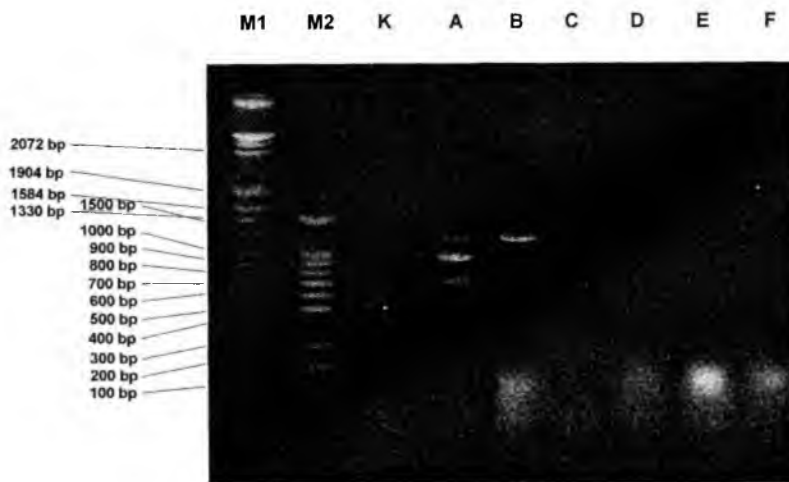
- KAWA 1 - (5'⇒3') GTG GAT TTT TAT TCC AAC A,

- KAWA 2 - (5'⇒3') CAA AAT TCA CCT ATA TTC TCA,
- KAWA 3 - (5'⇒3') (GTG)₅ [1, 3, 4],
- FP 1 - (5'⇒3') CAT ATG CCT AAA GAA CGA CG,
- FP 2 - (5'⇒3') CTC HGC RCA CTC CTT RCA GTA CCA,



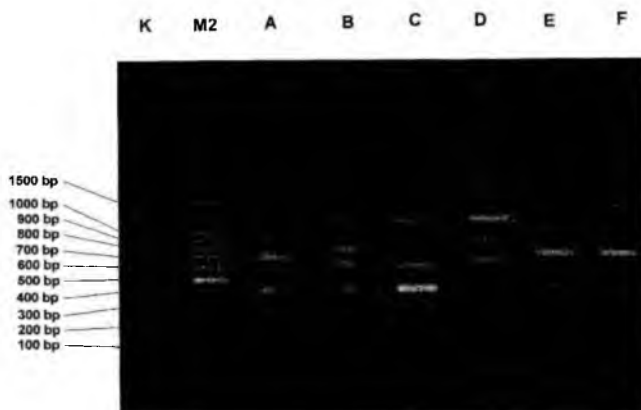
Rys. 1. Schemat izolacji DNA genomowego drożdży oraz reakcji PCR.

Fig. 1. Schema of genomic DNA isolation and PCR reaction.



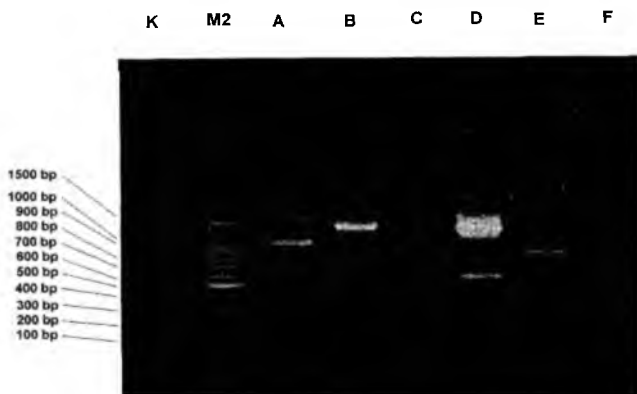
Fot. 1. Rozdziel elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primera (5' ⇒ 3') GTG GAT TTT TAT TCC AAC A; M1 – Lambda DNA/EcoRI + Hind III Markers, M2 – 100bp DNA Ladder, K – kontrola.

Photo. 1. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of (5' ⇒ 3') GTG GAT TTT TAT TCC AAC A; M1 – Lambda DNA/EcoRI + Hind III Markers, M2 – 100bp DNA Ladder, K – control.



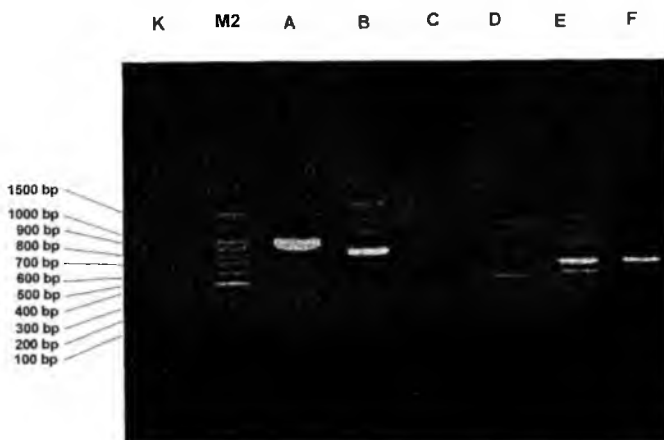
Fot. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primera mikrosatelitarnego (5' ⇒ 3') (GTG)₅; K – kontrola, M2 – 100bp DNA Ladder.

Photo. 2. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of (5' ⇒ 3') (GTG)₅ microsatellite primer; K – control, M2 – 100bp DNA Ladder.



Fot. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primera mikrosatelitarnego (5' ⇒ 3') CAT ATG CCT AAA GAA CGA CG; K – kontrola, M2 – 100bp DNA Ladder.

Photo. 3. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of (5' ⇒ 3') CAT ATG CCT AAA GAA CGA CG primer; K – control, M2 – 100bp DNA Ladder.



Fot. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z drożdży: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 i F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, uzyskanych przy użyciu primeru mikrosatelitarnego (5' ⇒ 3') CTC HGC RCA CTC CTT RCA GTA CCA; K – kontrola, M2 – 100bp DNA Ladder.

Photo. 4. The electrophoretic separation of DNA amplification products isolated from yeasts: A – *Pichia stipitis* (1), B – *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376, C – *Pichia stipitis* (2), D – *Candida shehatae* ATCC 58779, E – *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and F – *Pachysolen tannophilus* ATCC 60392, with use of (5' ⇒ 3') CTC HGC RCA CTC CTT RCA GTA CCA primer; K – control, M2 – 100bp DNA Ladder.

syntetyzowanych przez ARC SCIENTIFIC i Taq DNA polimerazy (Core KIT 201223 firmy Quiagen). Profile termiczne reakcji oraz ilość cykli dobrano w zależności od primerów [2]. Schemat izolacji DNA genomowego drożdży oraz reakcji PCR przedstawiono na rys. 1. W celu rozdzielenia produktów PCR stosowano elektroforezę w żelu agarozowym (stężenie agarozы 0,8%) z dodatkiem bromku etydyny w obecności markerów masy: Lambda DNA/EcoR I + Hind III Markers (M1) i 100 bp DNA Ladder (M2).

Podsumowanie

Przy zastosowaniu primeru KAWA 1 (Fot. 1) amplifikację DNA obserwowano jedynie dla szczepów *Pichia stipitis* (1) i *Yamadazyma stipitis* ATCC 58376. Primer KAWA 2 nie wykazywał działania z żadnym z badanych szczepów drożdży. Primery KAWA 3 (Fot. 2), FP 1 (Fot. 3) i FP 2 (Fot. 4) dawały produkty PCR pozwalające na zróżnicowanie omawianych gatunków drożdży.

LITERATURA

- [1] Baleiras Couto M.M., Hartog B.J., Huis in't Veld J.H.J., Hofstra H., Vossen J.M.B.M.: Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting, *Food Microbiol.*, **13**, 59-67, 1996.
- [2] Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J.: Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science*, **252**, 1643-1651, 1991.
- [3] Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences, *Yeast*, **7**, 61- 72, 1991.
- [4] Lieckfeldt E., Meyer W., Börner T.: Rapid identification and PCR differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting; *J. Basic Microbiol.*, **33**, 6, 413-426, 1993.
- [5] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

GENETIC DIFFERENTIATION OF KSYLOSE FERMENTING YEAST STRAINS

S u m m a r y

In this study was made an attempt to use polymerase chain reaction (PCR) method to differentiation of ksylose fermenting yeast species: *Pichia stipitis*, *Yamadazyma stipitis*, *Candida shehatae* i *Pachysolen tannophilus*.

ALINA KRYSZTYNOWICZ, WOJCIECH CZAJA, STANISŁAW BIELECKI

BIOSYNTETA I MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA CELULOZY BAKTERYJNEJ

Streszczenie

Produkcja celulozy bakteryjnej na skalę przemysłową jest jak dotychczas niewielka, głównie ze względu na trudności związane z wyselekcjonowaniem wysokoaktywnych szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach hodowli wglębnej, a także ze względu na wysokie koszty składników podłoża.

Dotychczasowe badania nad biosyntezą celulozy przez *Acetobacter xylinum* wykazały, że polimer ten jest wydzielany na zewnątrz komórek w postaci wstążek tworzących misternie splecioną sieć, która w warunkach hodowli stacjonarnej formuje na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą błonę. Dzięki swoim wyjątkowym właściwościom, celuloza bakteryjna znalazła zastosowanie, szczególnie w przemyśle papierniczym, włókienniczym, spożywczym oraz w medycynie.

Wstęp

Wytwarzanie polimerów metodami mikrobiologicznymi oraz ich aplikacja stanowi jeden z głównych kierunków badań w dziedzinie biotechnologii. Spośród drobno-ustrojów zdolnych do nadprodukcji celulozy znaczenie przemysłowe mają wyselekcjonowane szczepy *Acetobacter xylinum* [17, 25]. Bakterie te stały się modelem badawczym, który umożliwił wyjaśnienie drogi biosyntezy celulozy i jej regulacji, poznanie struktury polimeru oraz jego funkcji komórkowej [25, 14].

Badania nad biosyntezą celulozy przez *Acetobacter xylinum* wykazały, że polimer ten jest wydzielany na zewnątrz komórek w postaci wstążek tworzących misternie splecioną sieć, która w warunkach hodowli stacjonarnej formuje na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą błonę o grubości dochodzącej nawet do 8 cm [18]. Z błony takiej, po oczyszczeniu i wysuszeniu, otrzymuje się produkt przypominający cienki pergaminowy papier o grubości 0,01–0,5 mm, będący prawie czystą (w około 97%), wysokokrystaliczną α -celulozą, o stopniu polimeryzacji 2000–6000 [18, 29].

Dzięki swoim wyjątkowym właściwościom, celuloza bakteryjna znalazła zastosowanie, szczególnie w przemyśle papierniczym, włókienniczym, spożywczym oraz jako biomateriał w medycynie Tab. 1 [7, 15, 18, 19, 20].

Tabela 1

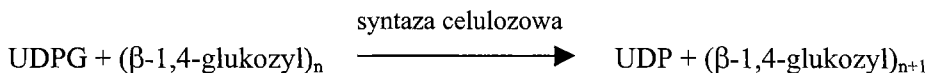
Zastosowanie celulozy bakteryjnej w różnych gałęziach przemysłu.
Application of bacterial cellulose in the different branches of industry.

Przemysł / Industry	Zastosowanie / Application
przemysł spożywczy food industry	<ul style="list-style-type: none"> • produkcja żywności niskokalorycznej (celuloza jako niskokaloryczny zamiennik tłuszczu), • czynnik stabilizujący zawiesiny, • wypełniacz poprawiający jakość żywności o konsystencji mazistej, • sporządzanie deserów smakowych np.. filipiński „Nata de coco” • inne artykuły sporządzane przy udziale celulozy bakteryjnej jako dodatku: pasztety, tofu (serek sojowy), kamaboko (gotowana pasta rybna), nadzienie do hamburgerów i kiełbasek, • nośnik w procesach immobilizacji enzymów i komórek drobnoustrojów, • zastosowanie błon celulozowych jako membran do ultrafiltracji i dializy.
przemysł papierniczy pulp industry	<ul style="list-style-type: none"> • produkcja szlachetnych gatunków papieru, • konserwacja dokumentów oraz dzieł sztuki, • produkcja membran głośnikowych.
medycyna medicine	<ul style="list-style-type: none"> • zastosowanie celulozy bakteryjnej jako sztucznych organów, • zastosowanie błon celulozowych jako materiałów opatrunkowych, • produkcja różnego typu tamponów chirurgicznych, podpasek higienicznych, pieluszek i innych materiałów sanitarnych.
przemysł włókienniczy i chemiczny textile and chemical industry	<ul style="list-style-type: none"> • modyfikacja za pomocą celulozy bakteryjnej typowych tkanin i dzianin syntetycznych, • surowiec do chemicznego przetwarzania na włókna celulozowe, • produkcja wysoko adsorpcyjnych materiałów służących do oczyszczania niektórych rodzajów ścieków przemysłowych, • produkcja niezwykle wytrzymałych kompozytów, o własnościach mechanicznych porównywalnych z własnościami tytanu.

Mechanizm biosyntezy celulozy

Bezpośrednim prekursorem w procesie biosyntezy celulozy jest glukoza w formie aktywnej urydynodifosforanowej pochodnej – UDPG, która w reakcji katalizowanej przez syntazę celulozową jest przenoszona na cząsteczkę primera – $(\beta\text{-1,4-glukozy})_n$ i

wiąże się anomerycznym węglem z grupą hydroksylową przy C-4 reszty glukozyłu, zgodnie z zapisem [28]:



Liczbę i stopień polimeryzacji syntetyzowanych łańcuchów glukanowych, pochodzących z jednego miejsca wydzielania komórki bakteryjnej, warunkują kompleksy enzymatyczne, zwane stacjonarnymi kompleksami terminalnymi, uważane do dziś za właściwą syntazę celulozową [25, 14, 13].

Kompleksy terminalne w liczbie 50–80 ułożone są w błonie komórkowej wzdłuż długiej osi komórki liniowo i komplementarnie do układu kanałów będących miejscem wydzielania elementarnych mikrofibryli celulozowych.

Biochemiczne badania mechanizmu regulacji syntezy celulozy wykazały, że aktywność syntazy celulozowej osiąga wysoki poziom, pod warunkiem obecności allosterycznego efektora, którym jest cykliczny nukleotyd – diguanozynomonofosforan (c-di-GMP).

W oparciu o obserwacje w mikroskopie elektronowym ustalono, że bakterie *Acetobacter xylinum* syntetyzują wysoce krystaliczne mikrofibryle celulozowe i wydzielają je na zewnątrz w postaci wstążki, która pozostaje związana z komórką [25, 13].

Wstążka celulozowa złożona z około 1000 łańcuchów β -glukanowych wykazuje szerokość rzędu 40±60 nm, grubość około 10 nm i długość około 10 μm (Fot. 1).



Fot. 1. Mikrofibryle celulozowe wydzielane przez bakterie *Acetobacter xylinum*.

Fig. 1. Cellulose microfibriles produced by *Acetobacter xylinum*.

Subelementarne fibryle celulozowe, wydzielane przez sąsiednie kanały w lipopolisacharydowej warstwie ściany komórkowej, stanowiące układ równoległe ułożonych 10 do 15 łańcuchów glukanowych nie ulegających dysocjacji, łącząc się wiązaniami wodorowymi, tworzą elementarne krystaliczne mikrofibryle grubości 3 nm. Powstałe elementarne mikrofibryle asocjując wiązaniami wodorowymi formują wiązki, a następnie wstążki. W konsekwencji powstaje charakterystyczna krystaliczna struktura celulozy [9].

Wstążki celulozowe pochodzące z wielu komórek bakteryjnych tworzą misternie splecioną sieć, która w warunkach hodowli statycznej szczepu *Acetobacter xylinum* formuje na powierzchni ciekłej pożywki zwartą, galaretowatą błonę o grubości dochodzącej do kilku centymetrów [25, 27].

Badania mechanizmu wydzielania fibryli celulozowych przez komórki bakterii *Acetobacter xylinum*, prowadzone w obecności związków chemicznych (Calcofluor, karboksymetyloceluloza, alkohol poliwinylowy), uniemożliwiających tworzenie pomiędzy łańcuchami glukanowymi wiązań wodorowych warunkujących krystaliczność struktury polimeru, dowiodły, że polimeryzacja i krystalizacja są procesami ściśle połączonymi ale zachodzącymi niezależnie od siebie [1, 13].

Warunki biosyntezy celulozy bakteryjnej i stosowane metody

Produkcja celulozy na skalę przemysłową jest jeszcze niewielka, głównie ze względu na trudności związane z wyselekcjonowaniem wysokoaktywnych szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach hodowli wgłębnej, a także ze względu na wysokie koszty składników podłoża.

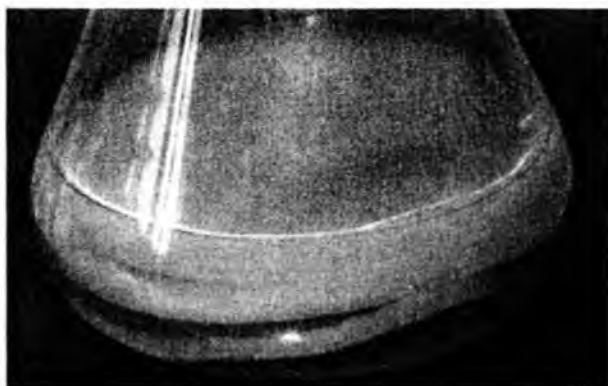
Generalnie, szczepy rodzaju *Acetobacter* zdolne są do biosyntezy celulozy w warunkach stacjonarnych, tworząc na powierzchni ciekłej pożywki galaretowatą, wielowarstwową błonę, uformowaną z misternie splecionej sieci mikrofibryli celulozowych i komórek bakteryjnych (Fot. 2). W hodowlach statycznych w zależności od składu podłoża hodowlanego i aktywności szczepu uzyskuje się od 0,1 do 1,0 g suchej masy celulozowej ze 100 ml podłoża.

Badania nad czynnikami wpływającymi na produkcję celulozy przez szczep *Acetobacter xylinum* w hodowli stacjonarnej wykazały, że o wydajności procesu syntezy decyduje głównie źródło węgla [17]. Stosowano podłoża z 7% zawartością cukrowca (fluktozy, glukozy, sacharozy lub laktozy). I tak po 16 dniach hodowli w 30°C, na podłożu z fruktozą otrzymywano celulozę w ilości 7,38 g/l, z glukozą – 1,0 g/l, z sacharozą – 5,25 g/l, z laktozą – 1,62 g/l.

Badania dynamiki nagromadzania masy celulozowej wykazały, że około 70% produktu tworzy się po 8 dniach hodowli w podłożach zawierających 1% źródła węgla. Inni autorzy [4] badający proces syntezy celulozy wykazali, że około 75% tego produktu nagromadza się podczas pierwszych 9 dni inkubacji i następnie ulega znacznemu

spowolnieniu. Z badań prowadzonych przez Embuscado [5] nad wpływem źródła azotu wynika, że stosowanie azotu organicznego w postaci, ekstraktu drożdżowego lub peptonu, warunkuje uzyskanie najwyższych wydajności procesu. Wpływ różnych czynników na biosyntezę celulozy bakteryjnej w warunkach stacjonarnych badali Embuscado i wsp. [6], stosując matematyczną metodę optymalizacji podłoża hodowlanego i warunków prowadzenia procesu, które pozwoliły na uzyskanie około 13 g celulozy/l. Ustalono następujące warunki biosyntezy celulozy:

- | | | |
|--|--|---|
| • fruktoza | 24,8 g/l, | |
| • sacharoza | 76,5 g/l, | |
| • ekstrakt drożdżowy | 3 g/l (nie optymalizowano), | |
| • pepton | 0,08% (w przeliczeniu na azot ogólny), | |
| • pH | 4,49, | |
| • temperatura | 29,3°C, | |
| • K ₂ HPO ₄ | 1,0 g/l, | } (ostatnie trzy składniki nie były optymalizowane) |
| • MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g/l, | |
| • NaCl | 0,1 g/l. | |

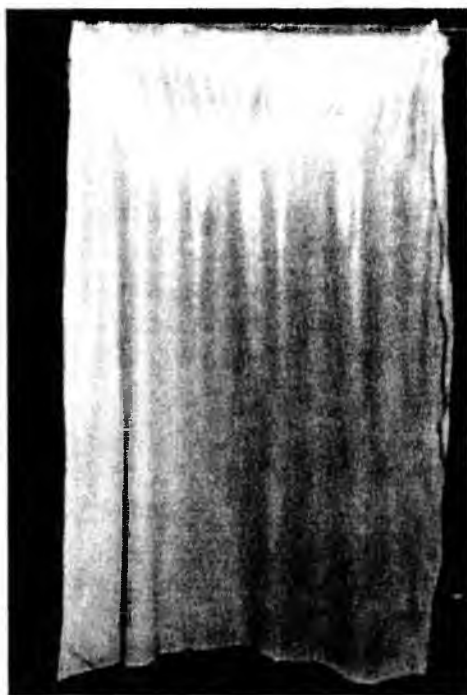


Fot. 2. Błona celulozowa wytworzona w warunkach hodowli stacjonarnej.

Fig. 2. Cellulose film produced in stationary culture conditions.

W wyniku optymalizacji wyeliminowano nieorganiczne źródło azotu. Otrzymany wynik biosyntezy jest dotychczas najlepszy spośród publikowanych wyników uzyskiwanych w hodowlach stacjonarnych.

Pomimo tych dość obiecujących danych, sposób hodowli stacjonarnej zalicza się do metod mało wydajnych i są one zastępowane metodami wgłębnymi w fermentorach. Generalnie należy stwierdzić, że wybór metody hodowli podyktowany jest praktyczną przydatnością wytworzonego produktu, który może być np. w formie błony (Fot. 3), rurek lub pulpy.



Fot. 3. Celuloza bakteryjna w formie błony o wymiarach 1m × 0,5m, wytworzona w warunkach hodowli stacjonarnej w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ.

Fig. 3. Bacterial cellulose film (1m × 0,5m) produced in stationary culture in Technical Biochemistry Institute of Łódź University of Technology.

Celulozę w formie rękawa otrzymali Sattler i Fiedler [26], prowadząc hodowlę bakterii *Acetobacter xylinum* w fermentorze poziomym, zaopatrzonym w obracający się wałek, zanurzony do połowy w podłożu hodowlanym. Polisacharyd nagromadzał się na wałku lub na szeregu współosiowych tarcz, formując po 5 dniach hodowli, mocno żelowaną błonę o grubości 2–3 centymetrów.

Proces biosyntezy celulozy może być również prowadzony metodą dwustopniową: wgłębną i stacjonarną. Okiyama i wsp. [16] pierwszy etap hodowli prowadzili w fermentorze w czasie 3 dni, po czym porcje cieczy przenosili na tace i w II etapie kontynuowali proces w warunkach stacjonarnych.

Otrzymywanie celulozy bakteryjnej w formie rurek podyktowane było głównie możliwością jej wykorzystania jako zamienników takich organów, jak: tchawica, moczowody, jelita, naczynia limfatyczne i krwionośne [18]. Sposób otrzymywania takiej formy celulozy polegał na hodowli bakterii *Acetobacter xylinum* w wewnętrznej i/lub zewnętrznej części węży celofanowych, teflonowych, porcelanowych, sporządzanych z tkanych lub nietkanych materiałów, z możliwością doprowadzenia tlenu. W takich

warunkach na powierzchni nośnika formuje się warstwa celulozy o grubości około 0,01 do 20 mm. Drugi sposób polegał na hodowli bakterii w zbiorniku, w warunkach stacjonarnych, w czasie 50 dni. Wytworzona w tym czasie błona celulozowa o grubości około 3 centymetrów, po uprzednim powleczeniu glicerolem i zamrożeniu w temp. -80°C , wykorzystana była do sporządzania rurek przy użyciu korkoboru. Trzeci sposób polegał na hodowli bakterii w przestrzeni między ściankami dwóch rurek o różnych średnicach. Otrzymano w ten sposób rurkę celulozową o średnicy wewnętrznej 2–3 mm, którą można wykorzystać jako sztuczne naczynie krwionośne.

Możliwość szerszego zastosowania celulozy bakteryjnej w przemysłach chemicznym, papierniczym czy włókienniczym uwarunkowana jest dostępnością i ceną. Spełnienie tych wymogów umożliwia produkcja polimeru w fermentorach, z wykorzystaniem wysokoaktywnych szczepów, zdolnych do biosyntezy celulozy w warunkach wglębnych na tanich surowcach odpadowych [17, 30].

Hodowla wglębna może być prowadzona metodą jednoetapową, podczas której następuje wzrost mikroorganizmów i produkcja celulozy. W metodzie tej można stosować trzy sposoby prowadzenia procesu biosyntezy: okresowy, okresowy z zasilaniem, ciągły.

Metoda dwuetapowa produkcji celulozy polega na stworzeniu warunków, w I etapie dla wzrostu mikroorganizmu i w II etapie dla właściwego procesu biosyntezy.

W niektórych hodowlach wglębnych, stosowany do biosyntezy celulozy bioreaktor musi być zaopatrzone w elementy pozwalające na związanie drobnoustroju i stopniowe formowanie mikrofibryli. Udowodniono bowiem, że celuloza formuje się z dużymi trudnościami w wolnej fazie ciekłej, pozbawionej miejsc wiązania, takich jak: grzebienie, łopatki, okładziny, elementy wypełniające [17]. W pewnych przypadkach do pożywki w bioreaktorze wprowadzano różnego typu nierozpuszczalne w wodzie mikrocząstki: piasek morski, ziemię okrzemkową lub szklane kulki. Stężenie dodawanych mikrocząsteczek było optymalizowane wraz ze stopniem napowietrzania. Wydajność biosyntezy celulozy w tak prowadzonym procesie, wzrosła trzykrotnie (z 1,1 do 3,6 g/l) w stosunku do wydajności celulozy uzyskiwanej w normalnych warunkach (bez obecności mikrocząstek) [30]. Ten wzrost wydajności syntezy celulozy jest według autorów rezultatem powstania wokół mikrocząstek swoistego biofilmu ograniczającego dopływ tlenu. Według ogólnie akceptowanej teorii Schramma i Hestrina [27] produkcja celulozy przez *Acetobacter xylinum* jest niezbędna dla komórek do osiągnięcia bogatej w tlen granicy faz: powietrze – pożywka. W wyżej wymienionym procesie wysokie stężenie rozpuszczonego tlenu, rzeczywiście nie doprowadziło do spadku produkcji celulozy. Konsekwentnie jednakże, rolę tlenu należy bardziej wiązać ze wzrostem syntezy kwasów ketoglukonowego i glukonowego, aniżeli z bezpośrednim oddziaływaniem na syntezę celulozy. Pozytywny efekt, uzyskany poprzez dodanie mikrocząstek, był więc według autorów spowodowany wytworzeniem się wokół po-

wierzchni tych cząstek lokalnych nisz pozbawionych tlenu, co dało rezultat w postaci faworyzowania procesu tworzenia celulozy, aniżeli oksydacji glukozy do kwasów keto- i glukonowego [30].

Jak już wcześniej wspomniano, głównym źródłem węgla dla wzrostu bakterii i biosyntezy celulozy jest glukoza lub fruktoza. Istota kompozycji pożywki, a szczególnie rodzaj źródła węgla, staje się jasna przy wzięciu pod uwagę metabolizmu bakterii *Acetobacter xylinum*. Cząsteczka glukozy jako źródło węgla jest, pomijając rolę źródła energii oraz prekursora syntezy celulozy, aktywnie przetwarzana przez bakteryjną dehydrogenazę do kwasów keto- i glukonowego. Zjawisko to nie tylko obniża kompletną wydajność celulozy, ale również obniża pH pożywki do wartości niekorzystnych dla procesu syntezy celulozy. Z tego powodu, stosując wysokie początkowe stężenie glukozy, mające na celu uzyskanie wyższej produktywności, nie otrzymujemy proporcjonalnie wyższej produkcji celulozy. Biorąc to pod uwagę, konieczne jest zastosowanie procesu fermentacji z kontrolowanym pH. Vandamme i wsp. [30] rozwinęli proces hodowli obejmujący kontrolę pH pożywki *in situ*, przy wykorzystaniu kwasu octowego, jako dodatkowego substratu dla hodowli szczepu *Acetobacter sp.* LMG 1518. Racjonalność takiego postępowania wiązała się ze zdolnością *Acetobacter sp.* do utleniania kwasu octowego do CO₂ i wody, generując przy tym dodatkowe ATP i faworyzując pożądany zakres pH. Aczkolwiek, kwas octowy nie prowadzi bezpośrednio do formowania celulozy, ATP pochodzące od kwasu octowego może zachować część glukozy, normalnie wykorzystywaną do syntezy ATP, prowadząc do bardziej wydajnego procesu syntezy celulozy. Co ciekawe, katabolizm kwasu octowego prowadzi równocześnie do wzrostu pH, co może przeciwdziałać spadkowi pH spowodowanemu formowaniem się kwasów keto- i glukonowego. Po przeprowadzeniu optymalizacji podłoża, Vandamme i wsp. [30], stosując następującą mieszaninę cukrów: fruktoza (70 g/l), glukoza (35 g/l) i kwas octowy (7,5 g/l) uzyskali w warunkach hodowli stacjonarnej wzrost do 28,4 g celulozy/l, co daje produktywność 6,7 g celulozy/l/dzień. Początkowa wartość pH = 5,5, która była optymalna dla syntezy celulozy, mogła być utrzymywana na stałym poziomie w czasie procesu fermentacji, co ilustruje korzystną zdolność buforowania wykazywaną przez kwas octowy, a związaną z obniżeniem się syntezy kwasów keto- i glukonowego [30].

Bardzo istotną kwestią w procesach hodowli *Acetobacter xylinum* jest również ustalenie sposobu szczepienia pożywki, zarówno w warunkach hodowli stacjonarnej, jak i wglębnej. Organizmy, takie jak *Acetobacter*, które wytwarzają duże ilości celulozy są dość trudne do przeniesienia z jednego inokulum do kolejnego, ponieważ bardzo często komórki zostają uwikłane w grubą błonę celulozową. W produkcji celulozy na dużą skalę, konieczne jest użycie dużego inokulum. Brown [2] w swoim patencie zaproponował wykorzystanie preparatów celulaz, które dodane w odpowiednim stężeniu do pożywki inokularnej, rozkładały otoczki celulozowe wokół komórek, przyczyniając

się do wzrostu ilości wolnych komórek. W obecności celulaz nie formuje się błona, a rozwija się typowa zawiesina komórek ($10 \cdot 10^7$ w porównaniu do $112 \cdot 10^5$ po 30 godzinach w przypadku normalnej hodowli).

Kolejnym istotnym aspektem w procesie biosyntezy celulozy jest ustalenie sposobu mieszania i napowietrzania, który nie powodowałby efektu burzliwości, niekorzystnie wpływającego na proces polimeryzacji i krystalizacji, a także na wydajność produktu. Stosując szczep *Acetobacter aceti* subsp. *xylum* ATCC 2178, autorzy patentu WO 88/09381 [7] otrzymali 10 g masy celulozowej/l/dzień w fermentorze o pojemności 300 l, prowadząc proces w czasie 45 godzin, w temperaturze 30°C, przy obrotach mieszadła 60 rpm i napowietrzaniu 0,6 vvm.

Wytwarzanie celulozy w dużej skali, w hodowlach z ciągłym mieszaniem napotyka na szereg trudności, z których największą jest niestabilność kultury przejawiająca się tendencją do spontanicznej mutacji w kierunku szczepów nieaktywnych, tzw. *Cel* [21, 22]. Szczep niestabilny może być z powodzeniem stosowany w hodowlach statycznych, gdzie wzrost bakterii i synteza celulozy przebiega w warunkach tlenowych na granicy faz: pożywka – powietrze. W warunkach hodowli wstrząsanej, w której wzrost bakterii ograniczony jest szybkością rozpuszczania się tlenu oraz następuje agregacja komórek syntetyzujących celulozę (co utrudnia dostęp tlenu), faworyzowane są komórki nieaktywne *Cel*.

Autorzy patentu 5144021 US [21], stosując metodę mutagenizacji, ulepszyli wiele szczepów *Acetobacter*, uzyskując kultury zachowujące pełną stabilność podczas długotrwałych hodowli, przebiegających w warunkach mieszania i napowietrzania. Ponadto, wyselekcjonowali oni dwa szczepy charakteryzujące się znacznie obniżoną zdolnością konwersji glukozy do kwasów glukonowego i ketoglukonowego. Stosując takie szczepy autorzy patentu uzyskiwali przeciętnie 0,1 g celulozy w formie kuleczek z 1 litra podłoża, w czasie 1 godziny, niezależnie od sposobu prowadzenia procesu w fermentorach [11, 21].

Czynnikiem decydującym o opłacalności produkcji celulozy bakteryjnej jest również koszt i dostępność składników podłoża hodowlanego. Stosowano węglowodany pochodzenia roślinnego, zbudowane z heksoz, a szczególnie glukozy i/lub fruktozy, a także pochodne innych heksoz lub pentoz. Dla szczepów „inwertazo⁺” stosuje się surowce zawierające sacharozę, jak np.: sok cukrowniczy, melasę, syropy, a dla szczepów „inwertazo⁻” – hydrolizaty tych surowców.

Substraty skrobiowe, jak: mąki, amylodekstryny, dekstryny mogą być wykorzystywane dla szczepów „amylazo⁺”. W przeciwnym przypadku można stosować enzymatyczne hydrolizaty skrobi [17].

W przypadku niektórych szczepów korzystne jest dodanie do podłoża etanolu lub glicerolu, mleczanu, octanu lub mannitolu, kwasu cytrynowego, które mogą stymulować produkcję celulozy [29].



Fot. 4. Celuloza bakteryjna w formie kuleczek wytworzona w warunkach hodowli wglębnej.
Fig. 4. The balls of bacterial cellulose produced in agitated culture.

Właściwości celulozy bakteryjnej i jej praktyczne wykorzystanie

Celuloza bakteryjna wytworzona w hodowli szczepów rodzaju *Acetobacter* charakteryzuje się wysoką czystością i w przeciwieństwie do celulozy roślinnej nie wymaga kosztownego i skomplikowanego procesu oczyszczania.

Etapy oddzielania i oczyszczania celulozy obejmują: filtrację, wyżymanie, przemywanie wodą, usunięcie komórek bakterii związanych z fibrylami celulozowymi lub na nich zaadsorbowanymi. Celulozę pozbawia się tych komórek stosując najczęściej merceryzację wodorotlenkiem sodu o stężeniu 1–4%, w temperaturze 60 do 100°C, w czasie kilku lub kilkunastu godzin, lub poprzez traktowanie kwasami organicznymi, jak np. kwasem octowym 5–8%, najlepiej w 100°C, w czasie 1 godziny [17, 18, 21].

Celuloza bakteryjna charakteryzuje się wysoką zawartością wody, w której 0,3% stanowi woda związana i 98,8% – woda wolna. Woda ta jest utrzymywana w strukturze celulozy dzięki słabym oddziaływaniom kapilarnym. Traktowanie celulozy lepкими roztworami, np. alkoholami cukrowymi powoduje pęcznienie celulozy i jej zmiękczenie. Tekstura tak otrzymanego produktu przypomina teksturę owoców, lub fibrylną strukturę mięśnia. Taka forma jest wykorzystywana na Filipinach do sporządzania deserów smakowych o nazwie „Nata” [15]. Celulozę bakteryjną w postaci pasty zastosowano jako czynnik stabilizujący zawiesiny, jako wypełniacz wzmacniający fizyczną strukturę łamliwych hydrożeli, jako wypełniacz poprawiający jakość żywności o konsystencji mazistej, zmniejszając ich lepkość. Celuloza może być też stosowana jako zamiennik tłuszczu oraz wypełniacz obniżający kaloryczność słodzonych produktów, np. dżemów [15].

Charakterystyczną właściwością celulozy bakteryjnej, różniącą ją od celulozy roślinnej jest wysoce uporządkowana struktura, utworzona przez mikrofibryle w kształcie wstążki o szerokości poniżej 100 nm. Struktura niezwykle cienkich włókienek splecionych ze sobą decyduje o bardzo dobrze rozwiniętej powierzchni, umożliwiającej adsorbowanie 100-krotnej (lub więcej) ilości wody w stosunku do jej suchej masy [15].

Zdolność do wiązania wody i tworzenia wiązań z włóknami celulozowymi innego pochodzenia umożliwia zastosowanie celulozy w produkcji szlachetnych gatunków papieru. Powlekając papier zawieszoną celulozą bakteryjną o wielkości cząstek 100–125 μm , w ilości 0,4–1,2%, w obecności czynnika dyspergującego, jak np. CMC, uzyskuje się produkt przewyższający jakością papier powlekany skrobią [22].

Dodatek celulozy bakteryjnej do włókien nieorganicznych (węglowych, glinowych), pozwala na uzyskanie produktu o zwiększonej wytrzymałości na zrywanie [29]. Impregnowanie bakteryjną celulozą materiałów hydrofobowych, jak np. poliestrowych, polipropylenowych, nadaje im doskonałą hydrofilowość, wysoką wytrzymałość, co stwarza możliwość ich zastosowania jako materiałów opatrunkowych [23].

Właściwości błon celulozowych formowanych podczas wzrostu bakterii na powierzchni ciekłych pożywek, w szczególności wysoka zawartość α -celulozy (powyżej 90%), znaczna smukłość mikrofibryli celulozowych wyrażona stosunkiem długości do średnicy wynosząca 200–500, średnica porów poniżej 3000 nm, porowatość 50–93%, wytrzymałość dynamiczna – 16–18 GPa, pozwalają na zastosowanie takich błon jako membran do ultrafiltracji i dializy [24].

Dobrze rozwinięta powierzchnia, duża trwałość i wysokie zdolności adsorpcyjne celulozy bakteryjnej sprawiają, że jest ona stosowana jako nośnik do immobilizacji enzymów i komórek drobnoustrojowych.

Błony celulozowe sprasowane w temp. 130°C, przyjmujące formę kartonów, stosowano jako stożkowe membrany głośnikowe. Charakteryzowały się one wysokim modułem Younga – 13,6 GPa, gęstością – 1060 kg/m^2 , prędkością rozchodzenia się dźwięku – 3580 m/s, ostrością rezonansu – 29,2. W porównaniu z diafragmami papierowymi, powyższe parametry były znacznie korzystniejsze [29].

Możliwość wykorzystania celulozy bakteryjnej w medycynie, a szczególnie jako sztucznych organów, stwarzają takie jej właściwości, jak: zawartość α -celulozy o wysokiej krystaliczności, wysoka wytrzymałość, bardzo dobra zgodność z żywą tkanką, a w szczególności z krwią. Opracowano sposób hodowli bakterii *Acetobacter xylinum*, pozwalający na wytwarzanie celulozy bakteryjnej w formie rurek o wymaganej średnicy. Otrzymane sztuczne naczynie krwionośne o średnicy wewnętrznej 2 do 3 mm wszczepiono psu, zastępując część aorty i żyły szyjnej. Ocena stanu przylegania skrępków i prześwitu po 1 miesiącu funkcjonowania naczynia, wypadła bardzo dobrze [18].

Jak już podkreślono, błona celulozowa uformowana na powierzchni ciekłej pożywki w hodowli stacjonarnej, charakteryzuje się wielowarstwową strukturą zbudowa-

ną z sieci mikrofibryli o średnicy poniżej 100 nm, wysoką zawartością wody (około 95%) w przestrzeniach między mikrofibrylami, nadającej jej właściwości żelu, czystością (zawartość α -celulozy powyżej 95%), wytrzymałością, porowatością, elastycznością. Ponadto błony takie, po dokładnym oczyszczeniu nie wywołują działania toksycznego, alergicznego i drażniącego. Stosowane jako opatrunek, stwarzają korzystne warunki gojenia się rany, bowiem nowe badania mechanizmu gojenia się rany wskazują na to, że wilgotne, a nie suche środowisko zapewnia optymalne warunki dla procesów naprawczych [12].

Podsumowanie

Właściwości celulozy bakteryjnej otwierają wiele możliwości jej praktycznego wykorzystania i znajduje to ekonomiczne uzasadnienie przy wzięciu pod uwagę, że jej produkcja może być oparta na tanich surowcach odpadowych przemysłu spożywczego lub farmaceutycznego.

LITERATURA

- [1] Brown R.M., Houghler C.H., Benziman M., White A.R., Cooper K.M.: Proc. Natl., Acac. Sci., USA, 77, 1980, 6678,
- [2] Brown R.M.: „Use of cellulase preparations in the cultivation and use of cellulose-producing microorganisms”, Patent 0258 038, 1988
- [3] Calvin J.R.: Biosynthesis of cellulose, Plant Biochem., J. Priess., 3, 1980, 543,
- [4] Dudman W.: J. Gen. Microbiol., 21, 1959, 312,
- [5] Embuscado M.E., Marks J.S., BeMiller J.N.: Food Hydrocolloids, 8, 1994, 407,
- [6] Embuscado M.E., Marks J.S., Be Miller J.N.: Food Hydrocolloids, 8, 1994, 419,
- [7] Fontana J. D., de Souza A., Fontana C. K., Torriani J.L.: Appl. Biochem. Biotech., 24/25, 1990, 253,
- [8] Geyer U., Klemm D., Schmauder H.P.: Acta Biotechnol., 14, 1994, 261,
- [9] Haighler C.H.: Cellulose chemistry and its applications, Eds. Nevell R.R., Zerionian S.H., Ellis Horwood C.H. Ltd, 1985, 151,
- [10] Kai A., Xu P.: Polymer J., 22, 11, 1990, 955,
- [11] Kent R.A., Stephens R.S., Wetsland J.A.: Food Technology, 5, 1991, 108,
- [12] Kleczyński S., Niedźwiecki T, Brzeziński K.: Polimery w medycynie, XY, 1, 2, 55, 1986,
- [13] Kudlicka K.: Postępy biologii komórek, 16, 1989, 197,
- [14] Lin F.C., Brown R.M., Cooper J.B., Dehner D.P.: Science, 230, 1985, 822,
- [15] Okiyama A., Motoki M., Yamanaka S.: Food Hydrocolloids, 6, 1993, 493,
- [16] Okiyama A., Shirac H., Kano H., Yamanaka S.: Food Hydrocolloids, 6, 1992, 471,
- [17] Patent PCT/FR88/00266,
- [18] Patent EP 0396 344 A2, 1990,
- [19] Patent EP 0 200 409 A2, 1986,
- [20] Patent WO 92/07946, 1992,
- [21] Patent 5, 144, 021, USA, 1992,

- [22] Patent PCF , US 92/0942,
[23] Patent 4, 919, 753, 1990,
[24] Patent JP 1-193335A, 1989,
[25] Ross P., Mayer R., Benziman M.: *Microbiol. Rev.*, **55**, 1991, 35,
[26] Sattler K., Fiedler S.: *Zentralbl. Microbiol.*, **145**, 1990, 247,
[27] Schramm M., Hestrin S.: *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 1954, 123,
[28] Swissa M., Aloni Y., Weinhausen H., Benziman M.: *J. Bacteriology*, **143**, 1980, 1142,
[29] Takai M., Tsuta Y., Watanabes S.: *Polymer J.*, **7**, 2, 1975, 137,
[30] Vandamme E.J., De Baets S., Vanbaelen A., Joris K., De Wulf P.: *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 1998, 93,

BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE AND ITS POTENTIAL APPLICATION

S u m m a r y

Commercial scale production of microbial cellulose has not been significant up to now because of the difficulties connected with a proper selection of high-active strains, which would be able to synthesise cellulose in an agitated culture, and with regard to the cost of nutrient medium components.

Investigation on cellulose biosynthesis by *Acetobacter xylinum* proved that the polysaccharide is secreted extracellularly as ribbons creating meticulously woven webs, that under stationary culture conditions form jelly-like pellicles at a surface of liquid media. Commercial applications of bacterial cellulose preparations depend on their properties. It can be applied in the pulp industry, textile industry, food industry, and in medicine. ☒

WOJCIECH CZUB, MARIANNA TURKIEWICZ

BIOSYNTeza SKLEROGLUKANU PRZEZ SZCZEP *SCLEROTIUM SP.*

Streszczenie

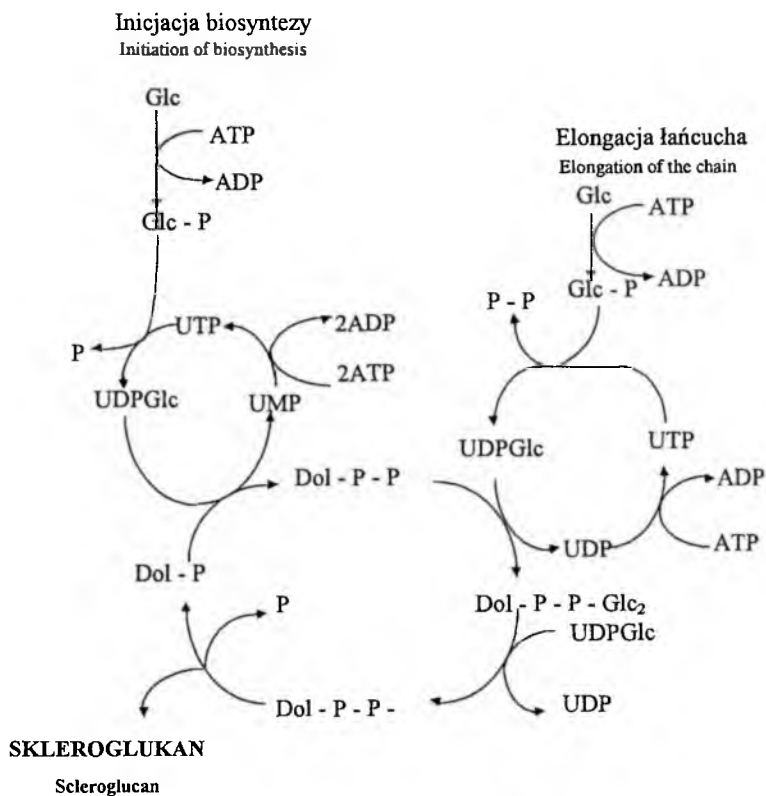
Wytwarzanie zewnątrzkomórkowych polisacharydów przez grzyby strzępkowe jest bardzo ściśle powiązane z warunkami hodowli: składem podłoża, napowietrzaniem, mieszaniem. Czynniki te wpływając na fizjologię mikroorganizmów, mogą znacznie zwiększać lub zmniejszać wydajność biosyntezy. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że szczep *Sclerotium sp. IBT* produkuje skleroglukan z maksymalną wydajnością w podłożu z sacharozą (3%) jako źródło węgla, gdy materiałem szczepiennym jest 4-dniowa kultura grzyba z hodowli węglanej, dodawana do podłoża w ilości 4% (v/v). Wykazano, że istotny wpływ na biosyntezę polisacharydu ma też odpowiedni stopień natlenienia podłoża oraz stosunek molowy C/N w podłożu. W najlepszym wariantcie hodowli w ciągu 7 dni wzrostu grzyba z 1 litra podłoża uzyskuje się 8,6 g polisacharydu, przy produktywności 1,7 g/g grzybni i stopniu konwersji sacharozy do skleroglukanu wynoszącym 29%.

Wstęp

Skleroglukan, wytwarzany przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Sclerotium*, jest pozakomórkowym β -(1 \rightarrow 3) glukanem, zawierającym liczne pojedyncze reszty glukopiranozy, połączone z liniowym szkieletem polisacharydu wiązaniami β -(1 \rightarrow 6)-glikozydowymi [1]. Cechują go interesujące właściwości: jest dobrze rozpuszczalny w wodzie i alkaliach, tworzy roztwory o dużej lepkości, które nawet przy niewielkim stężeniu polisacharydu są cieczami nienewtonowskimi. W pH z zakresu 2–12 trimero-we helikalne cząsteczki skleroglukanu zachowują swoją strukturę nawet w ciągu kilkuset dni w temperaturze 90°C, są więc zatem wyjątkowo termo- i pH-stabilne [2]. Te właściwości skleroglukanu czynią go bardzo atrakcyjnym produktem, który może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym jako czynnik żelujący, stabilizujący oraz wiążący wodę i inne substancje [5]. Stwierdzono ponadto, że skleroglukan wykazuje właściwości antynowotworowe i już przy niewielkich dawkach pobudza i stymuluje układ immunologiczny zwierząt doświadczalnych [6]. Mechanizm biosyntezy tego

polimeru jest zbliżony do syntezy innych mikrobiologicznych β -glukanów (rysunek 1). Przyjmuje się, że główną drogą wytwarzania skleroglukanu jest bezpośrednia synteza z glukozy pochodzącej z podłoża hodowlanego. Zachodzi ona, gdy przy dostatecznej zawartości cukru w podłożu limitowany jest inny niezbędny do wzrostu składnik pokarmowy (azot, siarka, fosfor) [3, 4].

W artykule prezentujemy wyniki wstępnych badań nad biosyntezą skleroglukanu przez szczep *Sclerotium sp. IBT*, obejmujące m.in. doświadczenia nad doбором podłoża, wpływem stosunku C/N i ilości inokulum na produkcję polimeru w warunkach hodowli węgłnej.



Dol- wielonienasycony lipid, prawdopodobnie dolichol

Dol -multi-unsaturated lipid, probably dolichol

Rys. 1. Biosynteza skleroglukanu przez szczep *Sclerotium*.

Fig. 1. Biosynthesis of scleroglucan by the fungal strain *Sclerotium*.

Materiały i metody badań

Materiałem biologicznym był szczep *Sclerotium sp.* z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ oraz *Sclerotium glucanicum* USDA 3006, użyty w charakterze szczepu wzorcowego. W celu aktywacji grzyby przeszczepiano ze skosów agarowych do 100 ml kolb Erlenmayera zawierających 20 ml pożywki o składzie: glukoza – 30 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 g/l; $(NH_4)_2SO_4$ – 1 g/l; KH_2PO_4 – 1 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01 g/l; ekstrakt drożdżowy – 1 g/l. pH pożywki doprowadzano do 4,5 za pomocą 1M H_2SO_4 . Hodowle prowadzono na wstrząsarce (120 obr/min, amplituda 5 cm), w 28°C w czasie 5 dni. Wyrosłą kulturą (20 ml) szczepiono 180 ml pożywki umieszczonej w kolbie płaskodennej i inkubowano w identycznych warunkach przez 7 dni. Tak przygotowaną kulturą zaszczepiano odpowiednią ilość pożywki o składzie podobnym do wymienionego wcześniej, z wyjątkiem glukozy, którą w niektórych doświadczeniach zastępowano innymi sacharydowymi źródłami węgla. Hodowlę prowadzono w czasie do 16 dni w 500 ml kolbach płaskodennych. Biomasę po uprzednim odwirowaniu (10000 g, 15 min, 4°C) umieszczano na sączku GFC, przemywano wodą destylowaną, suszono (105°C, 24 godz.) i ważono. Skleroglukan wytrącano z cieczy pohodowlanej izopropanolem dodawanym w proporcji 2:1 (v/v). Wytrącony polimer odsączano przemywano alkoholem, suszono (80°C, 24 godz.) i ważono. Cukry ogólne oznaczano metodą Dubois z wykorzystaniem glukozy jako wzorca.

Wyniki i dyskusja

W badaniach wstępnych (tabela 1) wykazano, że najlepszym podłożem do biosyntezy skleroglukanu jest podłoże, które jako źródło węgla zawiera sacharozę w stężeniu 3%. Z jednego grama sacharozy powstaje wówczas 0,228 g skleroglukanu. Zwiększenie zawartości cukru w pożywce do 40 g/l powoduje 22% spadek ilości wyprodukowanego polisacharydu (z ok 6,8 do 5,3 g/l), a wydajność konwersji cukru w skleroglukan obniża się o ponad 40% (z 0,228 do 0,134 g/g sacharozy, tabela 1). Jest to zgodne z danymi literaturowymi. Oprócz sacharozy dobrym źródłem węgla do produkcji skleroglukanu okazał się być hydrol – odciek po trzeciej krystalizacji glukozy stanowiący odpad w produkcji tego cukru ze skrobi. Chociaż wydajność biosyntezy polimeru w odniesieniu do źródła węgla jest w podłożu z hydrolem o ok. 50% niższa niż w podłożu o analogicznym stężeniu sacharozy, a bezwzględna ilość skleroglukanu wytworzonego w 1 litrze podłoża jest o 2,15 g (63%) niższa, to jednak masa polisacharydu wytworzonego przez 1 gram grzybni *Sclerotium sp.* okazała się być najwyższa wśród wszystkich rodzajów podłoży i wynosiła aż ok. 1,4 g/g grzybni. Najmniej korzystnym sacharydowym źródłem węgla jest niewątpliwie fruktoza. W podłożu z tym cukrem badany szczep wytwarza zaledwie ok. 1,9 g skleroglukanu, a stopień konwersji fruktozy w polisacharyd wynosi jedynie ok. 6%, jest więc 3,5-krotnie niższy niż w najlepszym wariantcie podłoża z sacharozą (Tabela 1).

Tabela 1

Wpływ źródła węgla na biosyntezę skleroglukanu (14 dniowa hodowla węglbna *Sclerotium sp.* – warunki i skład podłoża omówiono w materiałach i metodach).

Influence of carbon source on the scleroglucan biosynthesis (experiments were carried out, during 14 days, using parameters previously described in materials and methods).

Źródło węgla Carbon source g/l	Biomasa Biomass g/l	Skleroglukan Scleroglucan		Wydajność z 1g cukru Yield from 1g of carbon source g	Wydajność z 1g biomasy Yield from 1g of bio- mass g
		g/l	%		
glukoza 30 glucose	6,97	2,60	40,75	0,087	0,373
sacharoza 30 sucrose	6,46	<u>6,83</u>	100	<u>0,228</u>	1,057
sacharoza 40 sucrose	6,31	5,34	78,18	0,134	0,846
fruktoza 30 fructose	4,61	1,87	27,37	0,062	0,406
maltoza 30 maltose	4,79	3,58	52,41	0,119	0,748
hydrol 30	3,36	4,68	49,19	0,117	<u>1,393</u>

Tabela 2

Zależność wzrostu szczepu *Sclerotium sp.* od stopnia wypełnienia kolb podłożem (standardowe warunki hodowli, źródło węgla - sacharoza).

Dependence of the *Sclerotium sp.* strain growth on the volume of the growth medium (standard parametrs of incubation, carbon source - sucrose).

Ilość podłoża w 500 ml kolbie Volume of growth medium in 500 ml flask	dzień hodowli day of a culture		2	4	7	9	11	13	16
	50 ml (10%)	skleroglukan scleroglucan		0,34	0,40	0,63	0,39	<u>1,09</u>	1,11
biomasa biomass			0,35	2,13	4,55	5,58	<u>6,15</u>	5,70	5,40
100 ml (20%)	skleroglukan scleroglucan		0,22	0,76	0,85	<u>1,27</u>	0,60	0,73	0,41
	biomasa biomass		2,20	3,63	6,00	9,09	<u>9,75</u>	9,5	9,29
200 ml (40%)	skleroglukan scleroglucan		0,90	2,53	<u>6,84</u>	3,37	3,03	2,91	3,20
	biomasa biomass		3,06	5,40	6,46	6,98	<u>7,37</u>	7,06	6,94

Tabela 3

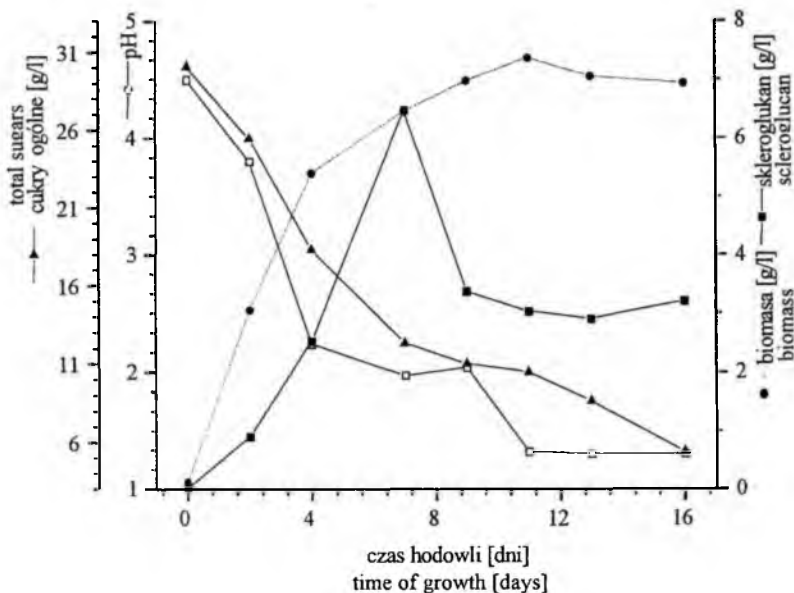
Wpływ inokulum na wzrost *Sclerotium sp.* i biosyntezę skleroglukanu. Hodowlę prowadzono w warunkach standardowych opisanych w materiałach i metodach z wykorzystaniem sacharozy jako źródła węgla. Influence of inoculum on growth of the *Sclerotium sp.* and scleroglucan biosynthesis (incubation was carried out using standard parameters described in materials and methods and sucrose as carbon source).

Czas inkubacji inokulum Time of incubation of inoculum	Ilość inokulum Volume of inoculum [% v/v]	Biomasa Biomass [g/l]	Skleroglukan Scleroglucan	
			[g/l]	%
4 dni days	2	4,675	6,4	74
	4	5,095	<u>8,6</u>	100
	6	4,545	5,6	65
	8	5,075	6,8	79
	10	4,575	3,0	35
7 dni days	2	5,565	1,2	14
	4	4,945	<u>5,4</u>	63
	6	4,78	3,4	40
	8	4,465	3,8	44
	10	4,525	0,6	7
10 dni days	2	4,61	1,2	14
	4	4,41	<u>4,8</u>	56
	6	3,67	4,5	52
	8	4,14	3,8	44
	10	4,5	2,1	24
14 dni days	2	4,45	1	11
	4	4,315	3,7	43
	6	4,375	<u>4,1</u>	48
	8	4,19	3,5	41
	10	4,245	2,9	34

W kolejnej serii doświadczeń został określony wpływ napowietrzania kultury grzyba na wydajność biosyntezy skleroglukanu. Zmieniając stopień wypełnienia naczyń hodowlanych podłożem od 10 do 40% stwierdzono, że we wszystkich wariantach hodowli największe nagromadzenie biomasy zostaje osiągnięte w 11 dobie, natomiast wzrost wypełnienia kolby podłożem, którego wynikiem jest spadek stopnia natleniania pożywki, powoduje skrócenie czasu maksymalnego nagromadzenia skleroglukanu z 11-16 dób, przy 10%-owym wypełnieniu kolb, do 9 dób przy 20%-owym i 7 przy 40%-owym. Podczas gdy poziom biomasy grzyba zmienia się po osiągnięciu maksimum tylko w niewielkim stopniu we wszystkich wariantach hodowli, ilość skleroglukanu utrzymuje się po osiągnięciu maksimum tylko w podłożu najlepiej napowietrzonym (10%). W dwu pozostałych wariantach szybko spada. Biorąc jednak pod uwagę ilość wyprodukowanego z 1 l podłoża polimeru (6,84 g), 5-6-krotnie wyższą niż w

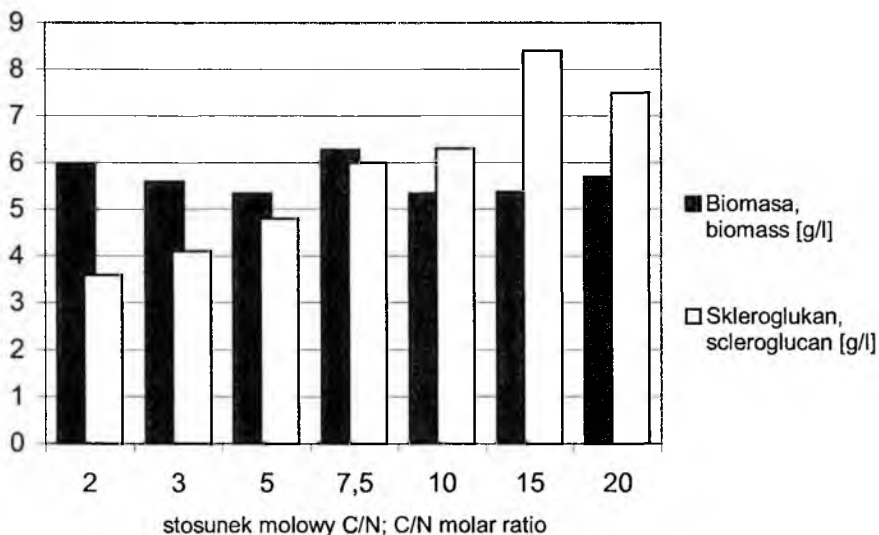
pozostałych wariantach, a także stopień konwersji sacharozy w produkt (23%) i korzystną jego proporcję względem wytworzonej biomasy (1,06g/g grzybni), wariant hodowli najslabiej napowietrzanej (40% wypełnienie kolby podłożem) okazał się najlepszy. Dalsze obniżanie stopnia natlenienia hodowli powodowało już spadek wydajności procesu biosyntezy skleroglukanu (wyniki nie zamieszczone). Przedstawione rezultaty dowodzą zatem, że dostarczenie zbyt dużej ilości tlenu powoduje zwiększenie tempa wzrostu grzyba i zmniejszenie produkcji zewnątrzkomórkowego glukanu. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Rau'a i wsp. [7] w hodowlach fermentorowych *Sclerotium glucanicum* przy różnych szybkościach mieszania. Chociaż synteza glukanów jest reakcją wymagającą energii, co powiązane jest bezpośrednio z wykorzystaniem tlenu, stymulację ich syntezy na drodze limitacji O_2 należy też rozpatrywać pamiętając, iż wiele systemów enzymatycznych jest indukowanych lub podlega represji przez tlen [4]. Jest też możliwe, że w trakcie hodowli przy różnych wypełnieniach kolb (10, 20, 40%) różnice w prężności tlenu mogą w sposób pośredni wpływać na wydajność syntezy poprzez wpływ na morfologię szczepu i w związku z tym na zmianę reologii środowiska (przy 10% wypełnieniu wzrost szczepu następuje w postaci pojedynczych kuleczek, natomiast przy wypełnieniu kolb hodowlanych podłożem w ilości 40% grzybnia rośnie jako duża pulpa). Innym czynnikiem rzutującym na wydajność syntezy skleroglukanu jest tworzenie przez grzyby rodzaju *Sclerotium* kwasu szczawowego, którego biosynteza konkuruje z biosyntezą skleroglukanu o substrat węglowy. W omawianej serii doświadczeń stwierdzono ponadto, że w przypadku dużej prężności tlenu w środowisku (wariant 1 hodowli, Tabela 2) następuje zwiększenie ilości produkowanego szczawianu z równoczesnym ograniczeniem tempa syntezy polisacharydu.

Rysunek 2 przedstawia dynamikę wzrostu *Sclerotium sp.* na podłożu z sacharozą przy 40%-owym wypełnieniu kolb pożywką. Biosynteza skleroglukanu jest ściśle powiązana ze wzrostem komórek i osiąga największą wydajność pod koniec fazy logarytmicznej. W trakcie tego procesu następuje duży spadek wartości pH (do 1,3). Po siódmej dobie hodowli obserwuje się znaczny spadek ilości skleroglukanu, chociaż stężenie źródła węgla w podłożu jest nadal znaczne. Na wydajność biosyntezy polimeru duży wpływ ma wielkość i wiek inoculum (tabela 3). Największe nagromadzenie wielocukru (8,6 g/l) ma miejsce, gdy hodowlę szczepi się 4% (v/v) 4-dniowego inoculum. Wydłużenie czasu hodowli inokularnej prowadzi do spadku ilości syntetyzowanego polimeru, przy czym im starszy materiał używa się do szczepienia tym maksymalna ilość wytwarzanego skleroglukanu jest coraz to mniejsza (63% dla 7-dniowego, 56% dla 10 i 48% dla 14-dniowego inoculum). Pewne rozbieżności pomiędzy danymi dla inoculum o różnym wieku wynikają najprawdopodobniej z wykorzystywania źródła węgla do wytwarzania produktów ubocznych.



Rys. 2. Dynamika wzrostu szczepu *Sclerotium sp. IBT* na podłożu z sacharozą (3%) przy 40% wypełnieniu kolb pożywką.

Fig. 2. Dynamics of the *Sclerotium sp. IBT* strain growth on medium containing 3% of sucrose at 40% flask fulfilment.



Rys. 3. Wpływ stosunku molowego C/N na biosyntezę skleroglukanu (podłożo z 3% sacharozą, ilość źródła azotu w zależności od stosunku C/N).

Fig. 3. An influence of C/N molar ratio on sclerotoglucan production (medium with 3% of sucrose, amount of nitrogen depend on C/N ratio).

Wyniki dalszych badań wskazują, że ilość syntetyzowanego polimeru w dużej mierze zależy od stosunku molowego źródła węgla i azotu w podłożu (Rysunek 3). Optymalny dla biosyntezy skleroglukanu przez badany szczep stosunek molowy C/N wynosi 15. Jego zmniejszenie do 2 prowadzi do spadku ilości polimeru o ok. 56% przy nieznacznym wzroście masy grzybni. Spadek wydajności syntezy polimeru (do 89% maksymalnej ilości) widoczny jest także przy zwiększeniu stosunku molowego C/N powyżej optymalnej wartości. Należy dodać, że o ile maksymalna wydajność biosyntezy skleroglukanu przez *Sclerotium sp. IBT* w najlepszym opracowanym wariantcie hodowli (podłoże z 3% sacharozy szczepione 4% 4-dniowego inokulum, hodowla węgłbna szczepu w 28°C w ciągu 7 dni przy 120 obr/min, amplitudzie 5 cm i 40% wypełnieniu kolb podłożem) osiągnięta w niniejszej pracy wynosi 8,6 g/l, to w tych samych warunkach odnośnikowy szczep *Sclerotium glucanicum* USDA 3006, uważany za szczep o walorach przemysłowych produkuje polisacharyd w ilości 10,6 g/l w 11 dniowej hodowli. Można przypuszczać, że dalsza optymalizacja procesu biosyntezy skleroglukanu przez szczep z naszej kolekcji pozwoli zmniejszyć tę różnicę.

Wnioski

1. Rodzaj źródła węgla i stopień napowietrzenia podłoża mają istotny wpływ na biosyntezę skleroglukanu.
2. Duży wpływ na wydajność biosyntezy polimeru ma wiek i wielkość inokulum.
3. Ilość syntetyzowanego polimeru zależy w dużej mierze od stosunku molowego źródła węgla i azotu w podłożu.

LITERATURA

- [1] Brigand G.: Scleroglucan, in *Industrial Gums* 3rd ed., Academic Press, New York, 1993, 461.
- [2] Cottrell I.W.: Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides, in *Fungal Polysaccharides*, Sanford P.A., Matsuda I. eds.; 1980 ACS Symposium Series 126.
- [3] Dunn G.M.: Nutritional requirements of microorganisms, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 1, Moo-Young eds., 1985, 113.
- [4] Forage R.G., Harrison D.E.F., Pitt D.E.: Effect of environment on microbial activity, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 1, Moo-Young eds., 1985, 253.
- [5] Kayser L.M.: 1979, U.S. Patent 3,495 990.
- [6] Prem P., Singh R., Whisler L., Tokuzen R., Nakahara W.: Scleroglucan an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glucanicum*, *Carbohydrate Research*, 37, 1974, 245.
- [7] Rau A., Gura E., Olszewski E., Wagner F.: Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing, *Industrial Microbiology*, 9, 1992, 19.

BIOSYNTHESIS OF SKLEROGLUCAN BY *SCLEROTIUM SP.* STRAIN**S u m m a r y**

Production of extracellular polysaccharides by moulds depends on culture conditions, including composition of growth medium, aeration and other parameters. These factors influence microbial physiology and therefore often increase or decrease yield of biosynthesis. Our article reports studies on scleroglucan biosynthesis by *Sclerotium sp.* strain from culture collection of Institute of Technical Biochemistry, Technical University of Lodz, under submerged culture conditions, focused on selection of a carbon source and an optimal C/N ratio, as well as on dynamics of scleroglucan biosynthesis dependently on a size of inoculum. During 7- days incubation we obtain from 1 litre of growth medium, 8.6 g of scleroglucan at specific productivity 1.7 gram/gram of biomass and 29% conversion of sucrose to scleroglucan. ❧

MAREK PRIMIK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ,
WANDA DUSZKIEWICZ-REINHARD

OTRZYMYWANIE HAPLOIDALNYCH FORM PIWOWARSKICH SZCZEPÓW DROŻDŻY

S t r e s z c z e n i e

Celem pracy było otrzymanie haploidalnych kultur wywodzących się ze szczepów piwowarskich *S. cerevisiae*. Zbadano dwa szczepy piwowarskie: R-II i R-9. Tylko szczep R-9 sporulował na badanych podłożach. Przeżywalność spor wyniosła 14 %. Otrzymano 20 populacji monosporowych, w tym 16 haploidalnych (posiadały typ płciowy). Jedna populacja (R-9/12) zarodnikowała, worki poddano rozkładowi. Przeżywalność spor wyniosła 30 %. Otrzymano 13 populacji monosporowych, w tym 10 o cechach haploidalnych.

Wstęp

Jednym z elementów postępu w przemyśle piwowarskim jest wprowadzanie nowych ras drożdży, o ulepszonych cechach technologicznych. Zainteresowania przemysłu obejmują przede wszystkim zwiększenie tempa metabolizmu maltozy i maltotriozy, wprowadzenie cechy typu „killer” oraz uzdolnień amylolitycznych, poprawę właściwości flokulacyjnych oraz modyfikację w kierunku niskiego poziomu produkcji diacetylu [10].

W programach poprawy cech technologicznych przemysłowych ras drożdży metodami zarówno klasycznej genetyki (mutagenizacja, hybrydyzacja płciowa i somatyczna), jak i za pomocą technik rekombinacji DNA *in vitro*, często odpowiednimi szczepami rodzicielskimi są formy haploidalne [5, 9, 12]. Przemysłowe rasy piwowarskie są zwykle poliploidalne, najczęściej tetra-, tri- lub aneuploidalne. Sporują słabo, rzadko tworząc tetrady, a spory charakteryzują się niską przeżywalnością. Kolonie otrzymane z pojedynczych spor są często homotaliczne lub nie mają zdolności do koniugacji z komórkami szczepu o przeciwnym typie płciowym [4]. Z tych względów otrzymanie dużej liczby kultur haploidalnych, przydatnych w dalszych pracach gene-

tycznych, jest zwykle uciążliwe. Z drugiej strony postęp w zakresie automatyzacji i komputeryzacji urządzeń do mikromanipulacji znacznie ułatwił najbardziej żmudny etap procedury pozyskiwania haploidów, co może pozwolić pokonać problem niskiej przeżywalności spor.

Celem niniejszych badań było otrzymanie stabilnych form haploidalnych z dwóch wybranych szczepów piwowarskich.

Material i metody badań

Szczepy

W badaniach użyto dwa szczepy piwowarskie *Saccharomyces cerevisiae*, pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii Żywności SGGW: R-II oraz R-9. Do oznaczania typu płciowego populacji monosporowych wykorzystano dwa haploidalne szczepy: *S. cerevisiae* PMY 274 (*MATa his 3-Δ200 leu 2 - 3, 112 ura 3 - 52 lys 2 - 801 trp 1-1*) oraz *S. cerevisiae* PMY 275 (*MATα his 3-Δ200 leu 2 - 3, 112 ura 3 - 52 lys 2 - 801 trp 1-1*), z Zakładu Genetyki IBB PAN w Warszawie.

PODŁOŻA - składniki w g/dm³

Podłoże YPD do presporulacji, kiełkowania spor i koniugacji: glukoza 20; pepton 20; ekstrakt drożdżowy 10; agar do podłoża stałych 20; pH 5,0 [11].

Podłoża sporulacyjne: McClary`ego: octan potasu 10; ekstrakt drożdżowy 2,5; glukoza 1; agar 15 [13], SPA: octan potasu 10; ekstrakt drożdżowy 1; glukoza 0,5; agar 20 [11] oraz KAc: octan potasu 10.

Zastosowano odczynniki następujących firm: agar, ekstrakt drożdżowy – BioMerieux, Nancy; pepton – BTL Łódź; glukoza, octan potasu – PPH, Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice.

Warunki sporulacji

Szczepy piwowarskie namnażano w podłożu YPD, po czym przesiewano równolegle na podłoża McClary`ego, SPA i KAc, w celu wywołania sporulacji. Obecność worków sporulacyjnych badano mikroskopowo, kilkakrotnie w ciągu 14 dni hodowli. Wydajność sporulacji wyrażono jako procentowy udział wszystkich worków w populacji 300 policzonych komórek. Wydajność tetrad wyrażono jako procentowy udział tetrad (worków zawierających 4 spory) w populacji 300 policzonych komórek.

Otrzymywanie populacji monosporowych

Komórki pobrane z podłoża sporulacyjnych zawieszano w roztworze enzymu β -glukuronidazy z *Helix pomatia*, 90000 jedn./cm³, Sigma, w celu strawienia ścian worków sporulacyjnych. Pojedyncze spory izolowano za pomocą mikromanipulatora

(Singer MSM System series 200, Singer Instruments), na stałym podłożu YPD. Płytki inkubowano następnie w 30°C przez 7 dni. Przeżywalność spor określano jako procent wyizolowanych spor, które utworzyły widoczne gołym okiem kolonie (populacje monosporowe).

Badanie populacji monosporowych

Zdolność do sporulacji badano na podłożu McClary`ego, po uprzedniej presporulacji na płynnym podłożu YPD. Typ płciowy nie zarodnikujących populacji monosporowych oznaczano na podstawie zdolności badanych kultur do koniugacji z jednym z haploidalnych szczepów testowych o znanym typie płciowym. Mieszaninę populacji monosporowej i szczepu testowego namnażano na płynnym podłożu YPD, po czym przesiewano na podłoże McClary`ego i po 4-7 dniach badano obecność worków sporulacyjnych.

Wyniki i dyskusja

Prace nad uzyskaniem form haploidalnych rozpoczęto od zbadania zdolności sporulacyjnych szczepów piwowarskich R-II oraz R-9.

Szczep R-II nie sporulował na żadnym z badanych podłoży. Brak zdolności do sporulacji stwierdzili u niektórych szczepów piwowarskich również inni autorzy [1, 8]. Wprawdzie szczep R-II w niniejszych badaniach okazał się nieprzydatny do otrzymania form haploidalnych, nie jest wykluczone, że uda się wywołać u niego zarodnikowanie poprzez dobór odpowiednich warunków presporulacji i sporulacji [4].

Szczep R-9 najwięcej worków sporulacyjnych tworzył w podłożu KAc, jednak dobrą wydajność sporulacji osiągał również na podłożach stałych (Tab. 1). Najwięcej tetrad zaobserwowano także w podłożu KAc, ale nawet w tych warunkach większość worków sporulacyjnych zawierała tylko 2 lub 3 zarodniki. W celu otrzymania form haploidalnych nie wydaje się jednak konieczne izolowanie tetrad, gdyż nawet worki 1-, 2- i 3-zarodnikowe najczęściej zawierają wszystkie 4 produkty mejozy, a mniejsza liczba spor wynika z tego, że nie wszystkie haploidalne (gdy sporulował diploid) jądra zostały otoczone ścianą [7]. Z tego względu za bardziej przydatne w tego typu pracach uznano znacznie wygodniejsze podłoża stałe.

Sporę szczepu R-9 izolowano metodą mikromanipulacji. Przeżywalność spor była stosunkowo niska i jest to typowa cecha kultur piwowarskich [1, 14]. Na przeżywalność spor może mieć wpływ szereg czynników takich jak przedłużony czas działania enzymu litycznego, przedłużone przechowywanie kultur na podłożu sporulacyjnym czy warunki kiełkowania. Decydującą rolę wydają się jednak odgrywać czynniki genetyczne – segregacja recesywnych mutacji letalnych [3], triploidalność bądź aneuploidalność szczepów oraz brak lub ograniczenie rekombinacji między chromosomami w czasie mejozy [6].

Tabela 1

Wpływ podłoża sporulacyjnego na wydajność sporulacji i wydajność tetrad szczepu piwowarskiego R-9.
Effect of sporulation medium on the efficiency of sporulation and tetrad formation of brewing strain R-9.

Podłoże sporulacyjne Sporulation medium	Wydajność sporulacji [%] Efficiency of sporulation [%]	Wydajność tetrad [%] Tetrad fomation [%]
Podłoże McClary`ego McClary`s agar	42	3
SPA	42	0,5
KAc	67	12

Tabela 2

Przeżywalność spor i charakterystyka otrzymanych populacji monosporowych.
Spore viability and characteristics of monospore populations.

Szczep Strain	Przeżywalność spor Spore viability	Liczba zbadanych populacji monosporowych Number of examined monospore populations		
		Ogółem Total	Sporulujące Able to sporulate	O oznaczonym typie płciowym With mating type
R-9	14	20	1	16
R-9/12	30	13	1	10

W kolejnym etapie pracy zbadano 20 otrzymanych populacji monosporowych (tab. 2). Tylko jedna kultura (R-9/12) była zdolna do sporulacji, natomiast 16 posiadało stabilny typ płciowy. Tak duży udział kultur wykazujących cechy form haploidalnych o typie płciowym α lub α wskazuje na to, że szczep R-9, mimo niskiej przeżywalności spor, może być obiecującym materiałem rodzicielskim w pracach nad genetyczną poprawą cech technologicznych szczepów piwowarskich.

Ze sporulującej kultury R-9/12 izolowano zarodniki i stwierdzono znaczny wzrost przeżywalności spor w porównaniu z macierzystym szczepem przemysłowym. Może on być wywołany eliminacją recesywnych mutacji letalnych oraz zaburzeń mejozy związanych z aneuploidalnością bądź triploidalnością szczepu R-9. Wśród 13 zbadanych populacji otrzymanych ze spor kultury R-9/12 typ płciowy posiadało aż 10, jednak 1 kultura była zdolna do sporulacji, co prawdopodobnie świadczy o występowaniu w rasie R-9 cechy homotalizmu. Cecha ta stwarza możliwości poprawy przeżywalności spor. Po uzyskaniu maksymalnej przeżywalności spor stabilne haploidalne formy heterotaliczne można otrzymać metodą hybrydyzacji płciowej ze szczepem heterotalicznym połączonej z serią krzyżówek wstecznych [2].

Wnioski

1. Ze szczepu R-9 otrzymano 26 kultur jednozarodnikowych o cechach haploidalnych.
2. Szczep R-II okazał się nieprzydatny do otrzymywania form haploidalnych.
3. Największą przeszkodę w pozyskiwaniu form haploidalnych ze szczepu R-9 stanowi niska przeżywalność spor.
4. Mimo niskiej przeżywalności spor szczep R-9 może być przydatny w programach genetycznej poprawy cech szczepów piwowarskich, gdyż komputeryzacja urządzeń do mikromanipulacji pozwala na szybką izolację dużej liczby spor, a większość otrzymanych z tego szczepu kultur jednozarodnikowych posiada cechy haploidalne.
5. Zdolność niektórych kultur do sporulacji może być wykorzystana do otrzymania szczepów o wyższej przeżywalności spor.

LITERATURA

- [1] Anderson E., Martin P.A.: The sporulation and mating of brewing yeasts. J. Instit. Brew., **81**, 1975, 242.
- [2] Bakalinsky A.T., Snow R.: Conversion of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* to heterothallicism. Appl. Environ. Microb., **4**, 1990, 849.
- [3] Beckerich J. M., Fournier P., Gaillardin C., Heslot H., Rochet M., Treton B.: Yeasts. s. 115-157. [w] Genetics and breeding of industrial microorganisms. ed. Ball C. CRC Press Inc. Boca Raton. Fla. 1984.
- [4] Bilinski C.A., Casey G.P.: Developments in sporulation and breeding of brewer's yeast. Yeast, **5**, 1989, 429.
- [5] Ibragimova S.I., Kozlov D.G., Kartasheva N.N., Suntsov N.I., Efremov B.D., Benevolensky S.V.: A strategy for construction of industrial strains of distiller's yeast. Biotech. Bioeng., **46**, 1995, 285.
- [6] Kielland-Brandt M.C., Nilsson-Tillgren T., Petersen J.G.L., Holmberg S., Gjermansen C.: Approaches to the genetic analysis and breeding of brewer's yeast. s. 421-437. [w] Yeast Genetics. Fundamental and applied aspects. eds. Spencer J.F.T., Spencer D.M., Smith A.R. 1983. Springer Verlag. New York. Berlin. Heidelberg. Tokyo.
- [7] Miller J.J.: Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. s.489-550. [w] The yeasts. Vol. 3. eds. Rose A. H., Harrison J., London 1989.
- [8] Oberman H., Pabiś E.: Obtaining of spore cultures and hybrids of top-fermenting brewers' yeast. Acta Aliment. Pol., **7** (31), 1981, 1-2, 81.
- [9] Pretorius I.S., van der Westhuizen T.J.: The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry - a review. South African J. Enol. and Viticul., **12** (1), 1991, 3.
- [10] Reed G., Nagodawithana T.W.: Yeast Technology. New York 1991.
- [11] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: Methods in Yeast Genetics. New York. 1990.
- [12] Sałek A., Arnold W.M.: Construction of ethanol-resistant, osmophilic industrial strains of *Saccharomyces* sp. Chem. Mikrob. Technol. Lebensm. 1994, **16** (5/6), 165

- [13] Spencer J.F.T., Spencer D.M., Schiappacasse M.C., Heluane H., Reynolds N., Figueroa L.I.: Two new methods for recovery and genetic analysis of hybrids after fusion of yeast protoplasts. *Current Microb.*, **18** (5), 1989, 285.
- [14] Stewart G.G., Panchal C.J., Russell I.: Current developments in the genetic manipulation of brewing yeast strains - a review. *J. Instit. Brew.*, **89**, 1983, 170.

OBTAINMENT OF HAPLOID FORMS OF BREWING YEAST STRAINS

S u m m a r y

The aim of the study was to obtain haploid populations from brewer's yeasts. Two brewing strains: R-II and R-9 were examined. Only strain R-9 was able to sporulate. Spore viability was 14%. 20 monospore populations were obtained, 16 of them were haploid (possessed mating type). One population (R-9/12) was able to sporulate, asci were dissected. Spore viability was 30%. 13 monospore populations were obtained, 10 of them were haploid.



AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ TRZMIEL

IMMOBILIZACJA SUBTILIZYN Z TRZECH GATUNKÓW BAKTERII: *BACILLUS SUBTILIS*, *B. LICHENIFORMIS* I *B. ALCALOPHILUS*

Streszczenie

W pracy opisano immobilizację subtilizyn: z *B. subtilis* IBTC-3 (typu BPN'), alkalostabilnej z *B. alcalophilus* BP92 oraz Carlsberg z *B. licheniformis* na celulozie Whatman oraz szkle porowatym, wykorzystując metodę diizocyjanianową. Lepsze rezultaty dała immobilizacja na szkle porowatym przy użyciu heksametylenodiizocyjanianu. Aktywność proteolityczna immobilizowanych preparatów wynosiła (37,5-46,7 mJ/g nośnika przy wydajności 33-44%). W pracy określono ponadto właściwości subtilizyny ze szczepu *B. subtilis* IBTC-3 immobilizowanej na szkle porowatym. Uzyskany preparat enzymatyczny wykazywał optymalną aktywność proteolityczną w pH = 10,7 i temperaturze 60-65°C.

Wprowadzenie

Subtilizyny (EC 3.4.21.62) są to proteiny serynowe pozakomórkowo wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bacillus*. Występują w kilku odmianach różniących się właściwościami fizykochemicznymi (m.in. optymalnym pH, masą cząsteczkową, punktem izoelektrycznym, składem aminokwasowym, a także zdolnością do hydrolizy syntetycznych substratów, m.in. BTEE, ATEE) [8]. Dzieli się je na dwie grupy:

- a) subtilizyny typu Carlsberg (dawniej subtilopeptydazy A), obejmujące serynowe proteiny *B. pumilus* i *B. licheniformis*.
- b) subtilizyny typu BPN' (dawniej subtilopeptydazy B), obejmujące subtilizyny BPN' i Novo, a także serynowe proteiny *B. subtilis* NRRL B-3411 i *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*.

Alkalofilne szczepy z rodzaju *Bacillus*, produkują subtilizyno-podobne proteiny, odbiegające nieco właściwościami od typowych subtilizyn [18]. Enzymy te wyróżniają się wysoce alkalicznym optimum pH działania, sięgającym nawet 11-12. Niektórzy uważają, że enzymy te są pochodnymi subtilizyny Carlsberg. Jednakże właściwości

immunologiczne alkalostabilnej serynowej proteiny wytwarzanej przez *B. alcalophilus* odbiegają od właściwości subtilizyny Carlsberg i BPN' [15].

Pomimo wspomnianych różnic, wszystkie subtilizyny mają identyczne centrum aktywne, w którym seryna, histydyna, kwas asparaginowy tworzą tzw. katalityczną triadę [15]. Cząsteczki subtilizyn zbudowane są z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych i są stabilizowane obecnością jonów Ca^{2+} [13].

Subtilizyny znane są z niewrażliwości ich struktury na obecność związków denaturujących [1,3]. Utrzymują aktywność proteolityczną i esterazową w stężonych roztworach mocznika, etanolu czy dioksanu [7,11], nie tracą również aktywności w środowisku silnie alkalicznym, w obecności detergentów, wybielaczy tkanin i środków piorących [6,7,11]. Subtilizyny wykazują szeroką specyficzność substratową. Rozszczepiają ponadto estry różnych N-acetylowanych i N-benzoilowanych L-aminokwasów, tzw. aktywność esterazowa.

W ostatnich latach interesującym kierunkiem rozwoju i modyfikacji procesów biotechnologicznych jest zastępowanie stosowanych w nich wolnych biokatalizatorów ich immobilizowaną formą.

Immobilizowane preparaty enzymów wykazują wiele istotnych zalet w porównaniu z formami natywnymi:

- ułatwiają kontrolę procesu,
- umożliwiają wielokrotne wykorzystanie biokatalizatora,
- pozwalają na otrzymanie produktu nie zanieczyszczonego enzymem (ważne dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego),
- pozwalają na prowadzenie procesów ciągłych,
- immobilizacja enzymu sprzyja celowej zmianie właściwości katalitycznych, w tym jego swoistości, zależności katalitycznej od pH, odporności na działanie czynników denaturujących.

Wprowadzenie i stosowanie immobilizowanych biokatalizatorów otworzyło nowe, wcześniej niedostępne drogi rozwoju enzymologii stosowanej [5].

Celem pracy były badania nad immobilizacją trzech serynowych proteinaz: subtilizyny IBTC-3, wytwarzanej przez bakterie *B. subtilis* IBTC-3, alkalostabilnej z *B. alcalophilus* i subtilizyny Carlsberg z *B. licheniformis* oraz określenie właściwości subtilizyny IBTC-3 immobilizowanej na szkle porowatym metodą diizocyjanianową.

Materialy i metody badań

Odczynniki

Do badań zastosowano następujące odczynniki: hexametylenodiizocyjanian ALDRICH, chlorek cyjanurowy SIGMA, aldehyd glutarowy ALDRICH, trietyloamina

POCH (Gliwice), hemoglobina wołowa BIOMED, ester etylowy N-benzoilo-L-argininy (BAEE) SIGMA, celuloza Whatman, szkło porowate CORMAY (Lublin).

Stosowane enzymy

- Subtilizyna IBTC-3 (typu BPN¹), wytwarzana przez szczep *B. subtilis* IBTC-3 znajdujący się w kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ. Enzym wyizolowany został z zateżonego filtratu podłoża pohodowlanego bakterii, a następnie wysolony siarczanem amonu w temperaturze 4°C i pH 7,4, a następnie rozpuszczony w 0,1% octanie wapnia i poddany dializie wobec 0,1% roztworu octanu wapnia o pH 6,4 w temperaturze 6°C przez 12 godzin. Kolejny etap obejmował oczyszczanie na DEAE-celulozie w 0,1% roztworze octanu wapnia o pH 6,4 w celu eliminacji białek balastowych, w tym α -amylazy i metaloproteiny. 1 cm³ podczyszczanego roztworu enzymu zawierał 7,5 mg białka i wykazywał aktywność proteolityczną 8,5 mJ A.
- Proteinaza alkalostabilna z *B. alcalophilus* PB92. Wykorzystano preparat handlowy MAXACAL. 0,5g preparatu rozpuszczano w 25 cm³ 0,1% octanu wapnia. 1 cm³ roztworu enzymu zawierał 1,6 mg białka i wykazywał aktywność proteolityczną 9 mJ A.
- Subtilizyna Carlsberg z *B. licheniformis*. Preparat handlowy MAXATASE. 0,5 g preparatu rozpuszczano w 25 cm³ 0,1% octanu wapnia. 1 cm³ roztworu enzymu zawierał 2 mg białka i wykazywał aktywność proteolityczną 10 mJ A.

Metody analityczne

Aktywność proteolityczną subtilizyn i ich immobilizowanych preparatów oznaczono metodą Ansona [4], stosując jako substrat zdenaturowaną mocznikiem hemoglobinę wołową.

Za jednostkę aktywności proteolitycznej Ansona [jA] przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach standardowych testu (6 cm³ inkubatu, 100 mg hemoglobiny, temperatura 25°C) hydrolizuje zdenaturowaną hemoglobinę z taką szybkością początkową, że ilość rozpuszczonego w 5% kwasie trójchlorooctowym produktu hydrolizy powstająca w czasie jednej minuty, daje po reakcji z odczynnikiem Folina wartość absorbancji odpowiadającą 1mM tyrozyny.

Aktywność esterazową oznaczono spektrofotometrycznie [12] przy $\lambda = 254$ nm, pH 8,0 i temperaturze 25°C, stosując jako substrat ester etylowy N-benzoilo-L-argininy (BAEE). Aktywność wyrażono w jednostkach esterazowych [jE], określających ilość mikromoli rozłożonego w ciągu jednej minuty substratu, w przeliczeniu na BAEE.

Białko oznaczano metodą Lowry [9].

Termostabilność określono w następujących warunkach preinkubacji: pH 9,0, za-

kres temperatur 20-70°C oraz czas $t = 10$ min. i $t = 60$ min.

Stałą Michaelisa-Menten określono dla hemoglobiny w następujących warunkach: optymalne pH, temperatura 25°C, stężenie substratu 0,1-2%. Wartości K_M i V_{max} wyznaczono z wykresu Lineweavera-Burka.

Immobilizacja enzymów na szkle porowatym lub celulozie metodą diizocyjanianową [2]

1 g nośnika (szkła porowatego o $d_p = 200-315$ μm , $D = 63,2$ nm lub celulozy Whatman) zawieszono w 50 cm^3 acetonu. Następnie dodano $\rho 2$ cm^3 trietyloaminy i hexametylenodiizocyjanianu i mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 45 min w temperaturze pokojowej. Nośnik przemyto 50 cm^3 acetonu, a następnie trzy razy 30 cm^3 wody. Po 1 g uaktywnionego nośnika łączono z 12,5 cm^3 roztworów badanych subtilizyn. Immobilizację prowadzono w temperaturze 4°C w ciągu 16-18 godzin, mieszając. Immobilizowany enzym oddzielono od roztworu, przemyto trzema porcjami 0,1% octanu wapnia i pozostawiono do suszenia w temperaturze pokojowej na 24 godziny.

Wyniki i dyskusja

Immobilizacja subtilizyn

W tabeli 1. zestawiono wyniki badań nad immobilizacją subtilizyn: z *B. subtilis* IBTC-3, alkalostabilnej z *B. alcalophilus* PB92 oraz Carlsberg z *B. licheniformis* na celulozie Whatman aktywowanej metodą diizocyjanianową. We wszystkich trzech przypadkach aktywność proteinaz na nośniku po immobilizacji jest zbliżona i wynosi 17-19 mJ/g nośnika przy wydajności 15-16% liczonej względem aktywności subtilizyn w roztworach użytych do procesu. Najwięcej białka (52,6 mg) osadziło się podczas immobilizacji subtilizyny IBTC-3, należy jednak brać pod uwagę, że ten enzym był najslabiej oczyszczony – jego aktywność właściwa wynosiła około 1,1 mJ/g białka. Najmniej białka na nośniku osadziło się podczas immobilizacji subtilizyny alkalostabilnej (aktywność właściwa tego enzymu była najwyższa i wynosiła 5,6 mJ/g białka).

W tabeli 2. zamieszczono wyniki badań nad immobilizacją subtilizyn na szkle porowatym aktywowanym metodą diizocyjanianową. Aktywność subtilizyn IBTC-3 i Carlsberg na nośniku po immobilizacji jest zbliżona i wynosi 46-48 mJ/g nośnika przy wydajności 38-44% liczonej względem aktywności w roztworach użytych do procesu. Najslabsze wyniki immobilizacji uzyskano dla subtilizyny alkalostabilnej (37,5 mJ/g nośnika przy wydajności 33,3%). Ilość białka wiązanego z nośnikiem była zdecydowanie mniejsza (11-22 mg/g nośnika) aniżeli podczas immobilizacji na celulozie Whatman. Najwięcej białka (22 mg) osadziło się podczas immobilizacji subtilizyny IBTC-3, natomiast najmniej podczas immobilizacji subtilizyny alkalostabilnej (11 mg/g nośnika).

Tabela 1

Immobilizacja na celulozie metodą diizocyjanianową.
Immobilization on cellulose with diisocyanate method.

Enzym Enzyme	Aktywność proteolityczna Proteolytic activity [mJA/g]	Wydajność Yield [%]	Białko Protein [mg/g]	Wydajność Yield [%]
Subtilizyna IBTC-3 Subtilisin IBTC-3	17	16	52,6	56
Subtilizyna Carlsberg Subtilisin Carlsberg	19	15,2	43,6	40
Proteinaza alkalostabilna PB92 High-alkaline proteinase PB92	17	15,1	22,8	26

Tabela 2

Immobilizacja na szkle porowatym metodą diizocyjanianową.
Immobilization on porous glass with diisocyanate method.

Enzym Enzyme	Aktywność proteolityczna Proteolytic activity [mJA/g]	Wydajność Yield [%]	Białko Protein [mg/g]	Wydajność Yield [%]
Subtilizyna IBTC-3 Subtilisin IBTC-3	46,7	44	22	16
Subtilizyna Carlsberg Subtilisin Carlsberg	48	38,4	16,7	11,6
Proteinaza alkalostabilna PB92 High-alkaline proteinase PB92	37,5	33,3	11	8,5

Właściwości immobilizowanej subtilizyny IBTC-3

W tabeli 3. oraz na rysunkach 1 i 2 prezentujemy właściwości preparatu immobilizowanej subtilizyny IBTC-3 na szkle porowatym aktywowanym heksametylenodiiizocyjanianem. Wybór tego preparatu podyktowany był jego wysoką aktywnością proteolityczną (46,7mJA/g nośnika), jak również ciekawymi właściwościami katalitycznymi w kierunku syntezy estru etylowego kwasu fenylooctowego (wyniki w trakcie opracowań). W celu porównania przedstawiamy również właściwości natywnej subtilizyny IBTC-3.

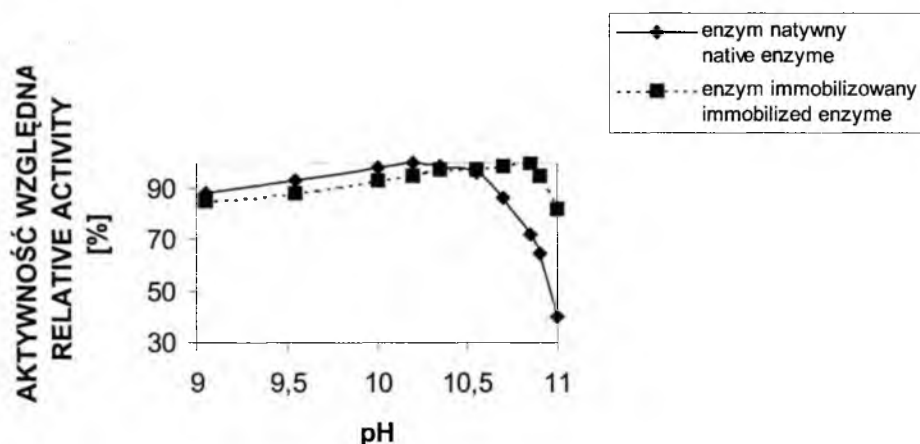
Tabela 3

Właściwości preparatów subtilizyny z *Bacillus subtilis* IBTC-3.

The properties of subtilisin preparations from *Bacillus subtilis* IBTC-3.

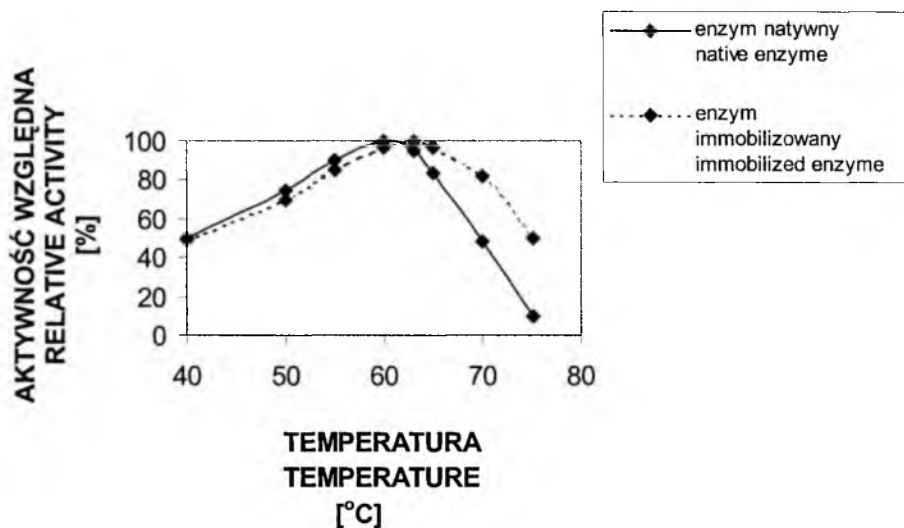
Parametry Parameters	Preparat natywny * Native preparation	Preparat immobilizowany Immobilized preparation
Optymalne pH Optimum pH	10,2	10,7
Optymalna temperatura Optimum temperature [°C]	60	60-65
Aktywność proteolityczna Proteolytic activity [mJA/g]		
-pH optymalne	600	46,7
-pH 7,3	522	41,90
Aktywność esterazowa Esterase activity [jE/g.]	7,39	2,41
Zawartość białka Protein content [mg/g]	283	22
K_M dla hemoglobiny K_M for hemoglobin [M] $\times 10^{-5}$	1,80	9,2
Czas półtrwania (tygodnie) Half-life,(weeks)	—	29

* dla preparatu stałego po wysoleniu siarczanem sodowym



Rys. 1. Wpływ pH na aktywność proteolityczną immobilizowanej subtilizyny IBTC-3.

Fig. 1. Effect of pH value on the proteolytic activity of immobilized subtilisin IBTC-3.



Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność proteolityczną immobilizowanej subtilizyny IBTC-3.

Fig. 2. Effect of the temperature on the proteolytic activity of immobilized subtilisin IBTC-3.

Prezentowane wyniki wskazują, że dla immobilizowanej subtilizyny ze szczepu *B. subtilis* IBTC-3 optymalne pH działania wobec hemoglobiny wynosi $\text{pH} = 10,7$, a więc wzrosło o 0,5 jednostki w porównaniu z formą natywną. Również optymalna temperatura działania subtilizyny po immobilizacji uległa przesunięciu w kierunku wyższych wartości (z 60°C do 65°C), co pośrednio świadczy o jej większej termostabilności.

Zjawiskiem niekorzystnym towarzyszącym procesowi immobilizacji subtilizyny ze szczepu *B. subtilis* IBTC-3 na szkle porowatym z wykorzystaniem metody diizocyjanianowej jest wzrost wartości K_M wobec hemoglobiny z $1,89 \cdot 10^{-5}$ [M] do $9,2 \cdot 10^{-5}$ [M], co świadczy o zmniejszeniu się powinowactwa immobilizowanej proteiny w stosunku do związków wielkocząsteczkowych. Stosunek aktywności proteolitycznej do esterazowej natywnego enzymu wynosi 81, a po immobilizacji tylko 19. Może to sugerować, że związki wielkocząsteczkowe (np. hemoglobina) mają utrudniony dostęp do centrum aktywnego immobilizowanej subtilizyny w porównaniu do związków niskocząsteczkowych (np. BAEE), w stosunku do których przejawia ona swoją aktywność esterazową.

Podsumowanie

Przedstawione wyniki badań potwierdzają, że subtilizyny są enzymami trudnymi do immobilizacji. Przypuszcza się, że przyczyna utraty właściwości katalitycznych

niektórych cząsteczek tych enzymów, znajduje się w naturze budowy przestrzennej subtilizyn. Z uwagi na brak mostków disulfidowych -S-S- [10], rolę stabilizującą jej przestrzenną strukturę, pełnią wiązania jonowe $-NH_3^+ \cdots OOC^-$ [19]. W przypadku stosowania większości metod kowalencyjnego wiązania białka enzymatycznego z nośnikiem, immobilizacja zachodzi prawie wyłącznie poprzez wolne grupy aminowe enzymu, co prawdopodobnie niszczy część wiązań jonowych i powoduje destabilizację struktury enzymu i w konsekwencji jego inaktywację. Aktywacja nośnika heksametylenodiiizocyjanianem powoduje, iż obok grup $-NH_2$, enzym wiąże się z nośnikiem również poprzez grupy $-OH$ [2, 17]. Można założyć, że cząsteczki subtilizyny związane przez grupy $-OH$ są nadal aktywne, natomiast te związane przez $-NH_2$ ulegają w przeważającej części inaktywacji.

Metoda z użyciem szkła jako nośnika umożliwiła otrzymanie z dużą powtarzalnością preparatów immobilizowanych subtilizyn: IBTC-3, Carlsberg i alkalostabilnej o aktywności proteolitycznej (37,5-48 mJ/g nośnika). Wydajność procesu liczona względem aktywności proteolitycznej jest zadowalająca (33,3-44% teoretycznej).

LITERATURA

- [1] Brown M.F., Schleich T.: *Biochemistry*, **4**, 1975, 3069.
- [2] Chen L., Tsao G.T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1974, 1463.
- [3] Christensen P.N., Holm P., Snder.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **55**, 1978, 109.
- [4] Davis N.C., Smith E.L.: *Methods of Biochemical Analysis, (Assay of Proteolytic Enzymes)*, New York, 1958.
- [5] Jęgorowa N., Samujłowa W.: *Biotechnologia, (Immobilizowane Enzymy)*, Poznań, **7**, 1992.
- [6] Keay L.: *Proc. IV IFS-Ferment. Technol. Today*, Kyoto, Japan, 1972, 289.
- [7] Keay L., Moser P.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 1969, 600.
- [8] Keay L., Moser P.W., Wildi B.S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 1970, 12.
- [9] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.I.: *J. Biol. Chem.* **193**, 1951, 265.
- [10] Markland F.S., Kurihara M., Smith E.L.: *J. Biol. Chem.* **247**, 1972, 5602.
- [11] Ottesen M., Svendsen J.B.: *Methods in Enzymology*, (by Perlman G.E., Lorand L.), 1970.
- [12] Rick W.: *Methods of Enzymatic Analysis, (Trypsin)*, (by Bergmayer, H.U.), New York, London: Acad. Press, **2**, 1974.
- [13] Roig M.G., Rashid D.H., Kennedy J.F.: *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, **55**, 1995, 95.
- [14] Stanffer C.E., Treptow, R.W.: *Biochem. Biophys. Acta*, **295**, 1973, 457.
- [15] Stryer L.: *Biochemia*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1997, 218.
- [16] Takii Y., Kuriyama N., Suzuki Y.: *Appl. Microbiol. Biotech.*, **34**, 1991, 57.
- [17] Triwien M.: *W: Immobilizowanyje Fermienty. Biotechnologia 7*, Moskwa, 1987.
- [18] Tsai Y.C., Lin S.F., Yamazaki M., Tamura G.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **883**, 1986, 439.
- [19] Wright Ch.S., Alden R.A., Kraut J.: *Nature*, **221**, 235, 1969.

THE IMMOBILIZATION OF SUBTILISINS FROM THREE BACTERIA SPECIES: *BACILLUS SUBTILIS*, *B. LICHENIFORMIS* AND *B. ALCALOPHILUS*

S u m m a r y

In the study the immobilization of subtilisins (from *B. subtilis* IBTC-3 (type BPN'), high-alkaline from *B. alcalophilus* BP92, Carlsberg from *B. licheniformis*) on Whatman cellulose and porous glass with diisocyanate method was carried out. The immobilization on porous glass activated by hexamethylene diisocyanate gave better results than on Whatman cellulose. The proteolytic activity of immobilized preparations was 37,5-46,7 mJA/g of support with 33-44% yield.

The properties of subtilisin from strain *B. subtilis* IBTC-3 immobilized on porous glass were investigated. The obtained enzymatic preparation showed optimum proteolytic activity at pH = 10,7 and at 60-65°C. ❧

AGNIESZKA MAJ, DANUTA WITKOWSKA

BADANIA NAD DEGRADACJĄ β -GLUKANÓW PRZY UDZIALE POZAKOMÓRKOWYCH HYDROLAZ GRZYBÓW *TRICHODERMA*

Streszczenie

Przedmiotem pracy było porównanie efektywności działania preparatów enzymatycznych grzybów *Trichoderma*, zawierających β -1,3-glukanazy i inne enzymy towarzyszące. Porównano proces hydrolizy β -glukanów różnego pochodzenia: laminarynu, β -glukanów drożdży piekarskich i drożdży *Yarrowia lipolytica* biomasy drożdży paszowych, grzybni *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Botrytis*. Proces był prowadzony w 50°C i pH 5,0 w zależności od ilości preparatu enzymatycznego i czasu działania. Najefektywniejszy w procesie degradacji β -glukanów drożdży *Y. lipolytica* i drożdży piekarskich okazał się preparat z *T. reesei* (RG). Natomiast w degradacji wszystkich rodzajów grzybni oraz laminarynu wyróżniał się preparat z *T. hamatum* (HMD).

Wstęp

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* wykazują zdolność wytwarzania licznych pozakomórkowych hydrolaz, w tym enzymów litycznych (β -1,3-glukanaz, chitynaz, celulaz i innych), odgrywających ważną rolę w hydrolizie substratów zawierających β -glukany. Enzymy te są wykorzystywane we współczesnej biotechnologii, ochronie roślin oraz w przemyśle spożywczym, paszowym, papierniczym i innych. Prezentowana praca jest fragmentem badań, mających na celu otrzymanie preparatów enzymatycznych z hodowli wybranych szczepów z rodzaju *Trichoderma* i zbadanie ich właściwości biotechnologicznych. Celem tej części badań było określenie i porównanie efektywności działania preparatów enzymatycznych zawierających β -1,3-glukanazy i inne enzymy towarzyszące w hydrolizie β -glukanów różnego pochodzenia. Ocena taka może być pomocna w ukierunkowaniu aplikacji preparatów enzymatycznych.

Materiały i metody badań

W badaniach wykorzystano preparaty enzymatyczne, otrzymane we wcześniejszych pracach (dane niepublikowane) z następujących hodowli na podłożu Saundersa:

preparat **HD** – *T. harzianum* T-33 (z dodatkiem 2% drożdży paszowych (DP) i 2% celulozy Avicel (AC)); preparat **RD** – *T. reesei* M 7-1 z dodatkiem 6% DP i 2% AC; preparat **HG** – *T. harzianum* T-33 z dodatkiem 6% grzybni odpadowej *Trichoderma* (GT); preparat **RG** – *T. reesei* M 7-1 z dodatkiem 6% GT i 2% AC; preparat **HMD** – *T. hamatum* C-1 z dodatkiem 2% DP i 2% AC. Preparaty enzymatyczne scharakteryzowano pod względem następujących aktywności enzymatycznych: **β -1,3-glukanaz** wobec laminarynu, (Sigma) [8]; **chitynaz** wobec chityny koloidalnej (Sigma) [14]; **FP-az** wobec bibuły filtracyjnej Whatam nr 1 [2]; **CMC-az** wobec NaCMC (Sigma) [2]; **ksylanaz** wobec ksylanu (Xylan from birchwood, Sigma) [1]; **β -1,6-glukanaz** wobec pustulanu (Sigma) [8]; **α -1,3-glukanaz** wobec lichenanu (Sigma) [8]; **α -1,6-glukanaz** wobec nigeranu (Sigma) [8]; **proteinaz** metodą Ansona wobec kazeiny (BDH) [6].

Hydroliza biopolimerów ścian komórkowych zawartych w biomasie grzybów i drożdży. Mieszaninę reagującą (3ml), którą stanowiło 0,15 g poszczególnych substratów (S) (preparowane β -glukany drożdży piekarskich i drożdży *Yarrowia lipolytica*, suszona biomasa drożdży paszowych, sucha grzybnia *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea*), (5% w/v) oraz roztwory preparatów enzymatycznych o aktywności β -1,3-glukanaz 1,68 U/ml (**HD-1**, **RD-1**, **HG-1**, **RG-1**, **HMD-1**) i 3,36 U/ml (**HD-2**, **RD-2**, **HG-2**, **RG-2**, **HMD-2**) w 0,05 M buforze octanowym o pH 4,8 wstrząsano na wstrząsarce laboratoryjnej w temperaturze 50°C przez 2, 4, 12 i 24 godziny i zagotowano (10 minut) we wrzącej łaźni wodnej celem przerwania reakcji. W hydrolizatach oznaczano: zawartość cukrów redukujących [3], glukozy (zestaw diagnostyczny BIOCHEMTEST (POCH, Gliwice) do enzymatycznego oznaczania glukozy) oraz N-acetyloglukozoaminy [4]. Wydajność procesu hydrolizy obliczono na podstawie ilości uwolnionych cukrów redukujących w stosunku do masy użytego substratu i wyrażono w procentach.

Hydroliza laminarynu. Mieszaninę inkubacyjną (1% roztwór laminarynu oraz roztwory preparatów enzymatycznych o aktywności 0,78 U/ml) inkubowano 30 i 120 minut w 50°C, zagotowano (10 minut) we wrzącej łaźni wodnej i po schłodzeniu oznaczono ilość glukozy (zestaw diagnostyczny BIOCHEMTEST - POCH, Gliwice). Wydajność procesu hydrolizy laminarynu obliczono na podstawie ilości uwolnionej glukozy w stosunku do masy użytego substratu i wyrażono w procentach.

Omówienie i dyskusja wyników

Stosowane w pracy preparaty enzymatyczne charakteryzowały się szerokim spektrum aktywności enzymatycznych. Wartości aktywności poszczególnych enzymów uzależnione były zarówno od gatunku grzyba, jak i od źródeł węgla i energii zastosowanych jako induktory w hodowli, z których otrzymano preparaty. Wielu auto-

rów podkreśla w swoich pracach indukcyjny charakter pozakomórkowych hydrolaz grzybów *Trichoderma* (β -1,3-glukanaz, chitynazy, celulazy) i stosowanie takich induktorów jak grzybnia, biomasa drożdży, ściany komórkowe grzybów i drożdży, celuloza itp. [5], [6], [7], [9], [11], [12], [13], [14], [15].

Najbardziej efektywnym spośród badanych okazał się preparat otrzymany z *T. hamatum* (HMD). Wyróżniał się on najwyższymi aktywnościami sześciu enzymów spośród dziesięciu oznaczonych, tj. β -1,3-glukanaz, FP-az, CMC-az, ksylanaz, lichenaz i proteinaz (Tab. 1).

Tabela 1

Charakterystyka preparatów enzymatycznych (Aktywność wyrażono w $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ preparatu).

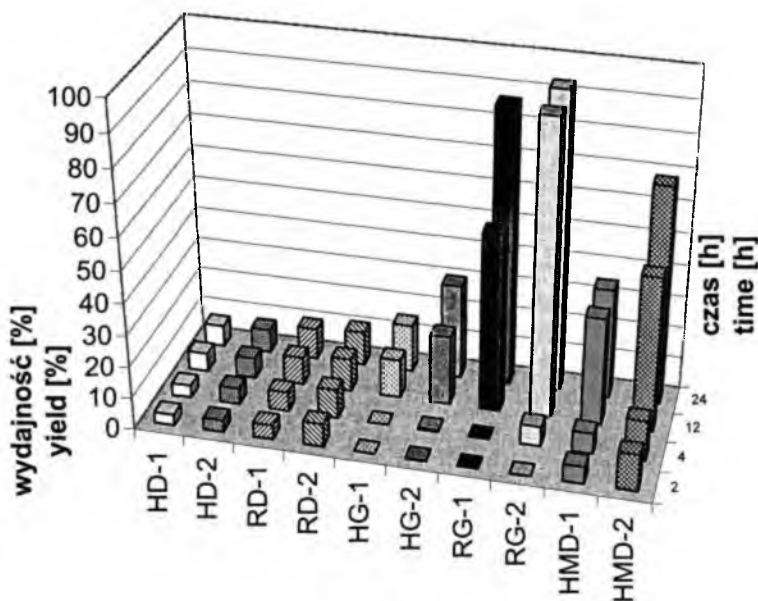
Characteristic of enzymatic preparations (enzymes activity in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ of preparation).

Aktywność enzymatyczna Enzyme activity	Rodzaj preparatu enzymatycznego Kind of enzyme preparation				
	HD	RD	HG	RG	HMD
β -1,3-glukanazy β -1,3-glucanases	427	457	221	108	1034
FP-azy FP-ases	36,1	42,8	34,3	43,3	129,0
CMC-azy CMC-ases	160,4	70,0	0,0	351,6	328,5
chitynazy chitinases	27,0	49,6	55,4	35,7	38,3
ksylanazy xylanases	150	200	100	6200	7080
mannanazy mannanases	35,9	44,9	35,9	26,9	18,0
pustulanazy pustulanases	1,2	0,65	0,0	18,0	9,0
α -1,3-1,4- glukanazy α -1,3-1,4- glucanases	996,8	736,4	116,7	170,6	619,6
lichenazy lichenases	740,8	893,5	857,6	687,0	1481,7
proteinazy * proteinases *	56,1	25,2	16,8	7,6	106

* Aktywność wyrażono w $\text{mmol}/\text{min} \cdot \text{g}$

* Activity in $\text{mmol}/\text{min} \cdot \text{g}$

Porównując aktywności enzymatyczne otrzymanych preparatów nasuwają się pewne prawidłowości. Preparaty otrzymane z hodowli z dodatkiem drożdży (łącznie z celulozą) wyróżniały się większą wartością aktywności β -1,3-glukanaz, α -1,3-1,4-glukanaz, a także proteinaz, w porównaniu do preparatów otrzymanych z hodowli z dodatkiem grzybni odpadowej. Natomiast preparaty otrzymane z hodowli, w której stosowano oprócz drożdży lub grzybni także dodatek celulozy, charakteryzowały się większą wartością aktywności celulaz (CMC-az, FP-az i ksylanaz), co świadczy o intensywniejszej indukcji tych enzymów. Dodatkowa obecność celulozy w podłożu (oprócz drożdży paszowych) wspomagała również indukcję α -1,3-1,4-glukanaz (Tab. 1).

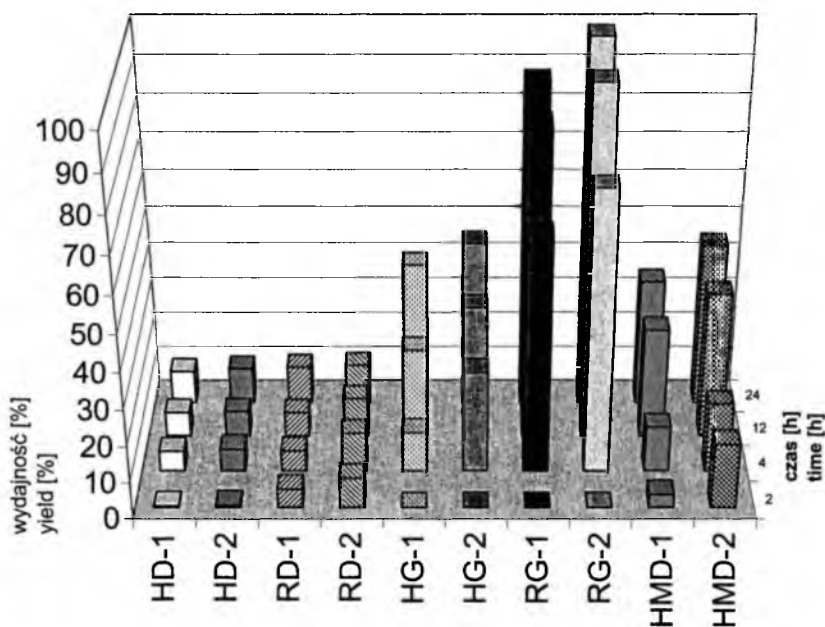


Rys. 1. Wydajność procesu hydrolizy preparowanych β -1,3-glukanów drożdży *Yarrowia* (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 1. Yield of hydrolysis of prepared β -1,3-glucanases of *Yarrowia lipolytica* (in reducing sugars).

Badane preparaty enzymatyczne różniły się także efektywnością degradacji zarówno preparowanych β -1,3-glukanów (drożdży *Yarrowia lipolytica*, drożdży piekarskich) oraz suchej biomasy grzybni *Trichoderma*, *Fusarium*, *Botrytis*, a także drożdży paszowych. W przypadku hydrolizy β -glukanów: drożdży *Yarrowia* i drożdży piekarskich, efektywniejszym działaniem wyróżnił się preparat z *T. reesei* (RG) (otrzymany z hodowli na grzybni). Osiągnięto z jego udziałem około 60% wydajności procesu hydrolizy po 4 h, a wraz z wydłużaniem czasu do 12 h, uzyskano wydajność rzędu 80% (rys. 1, 2). Podobnie większa ilość glukozy (około 50 mg/150 mg S) była uwal-

niana z β -glukanów, niż z innych substratów pod wpływem preparatu z *T. reesei* (**RG**), uwalniając około 50 mg glukozy w warunkach metody (Rys. 4 B). W przeciwieństwie natomiast do preparowanych β -glukanów drożdży *Yarrowia* oraz drożdży piekarskich, biopolimery ścian komórkowych zawarte w suchej biomase drożdży paszowych były mniej podatne na hydrolizę pod działaniem preparatów enzymatycznych, powodując hydrolizę na poziomie od 7,5-11% (Rys. 3).

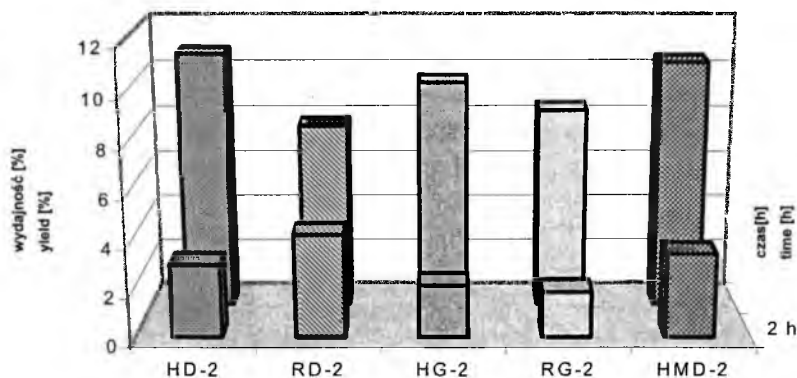


Rys. 2. Wydajność procesu hydrolizy preparowanych β -1,3-glukanów drożdży piekarskich (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 2. Yield of hydrolysis of prepared β -1,3-glucanases of baker's yeast (in reducing sugars).

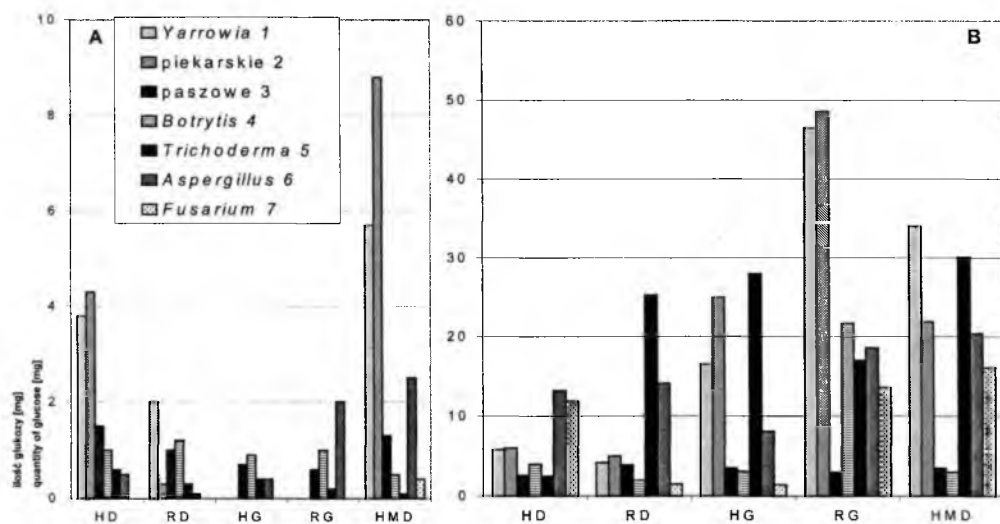
Ponieważ preparaty enzymatyczne były stosowane w ilości odpowiadającej tej samej wartości aktywności β -1,3-glukanaz, a preparat **RG** charakteryzował się najmniejszą aktywnością tego enzymu spośród badanych preparatów, wobec tego był stosowany w większej ilości niż pozostałe preparaty. Można więc sądzić, że udział enzymów towarzyszących także był większy, a szczególnie aktywność lichenaz (β -1,3-1,4-glukanaz) mogła znacznie wspomagać ten proces.

Enzymy zawarte w pozostałych preparatach, tj. z *T. hamatum* (**HMD**) i *T. harzianum* (**HG**), hydrolizowały β -glukany na poziomie około 40% wydajności (Rys. 1, 2). Proporcjonalnie uwolnione zostało mniej glukozy z biomasy drożdży w porównaniu z preparatami z *T. reesei* (Rys. 4).



Rys. 3. Wydajność procesu hydrolizy biomasy drożdży paszowych (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 3. Yield of hydrolysis of fodder yeast biomass (in reducing sugars).

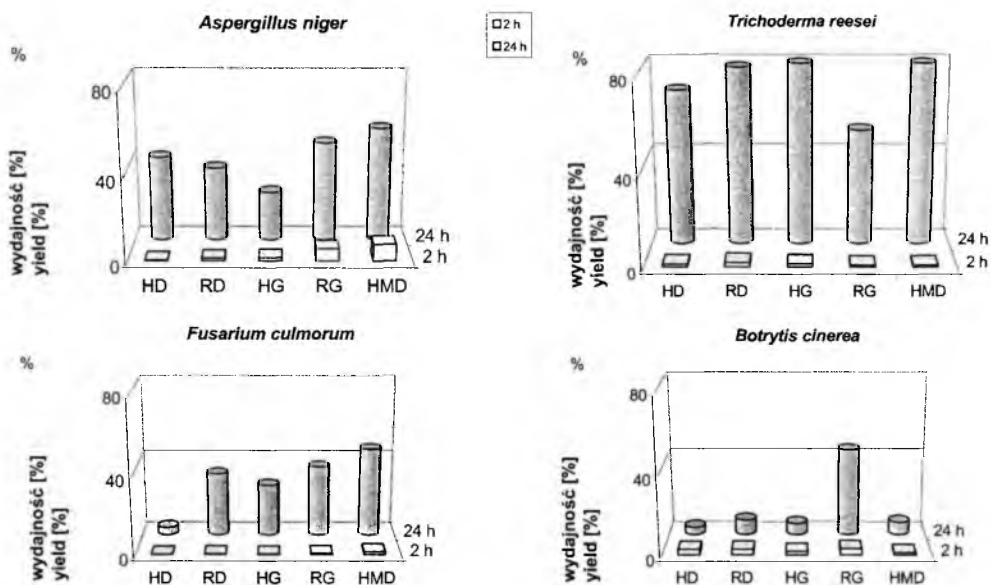


Rys. 4. Ilość uwolnionej glukozy [mg] po hydrolizie β-glukanów (1, 2) oraz biomasy (3, 4, 5, 6, 7) po 2 godzinach (A) i 24 godzinach (B).

Fig. 4. Quantity of glucose [mg] released from β-glucans after 2h (A) and after 24 h (B) of hydrolysis.

Proces degradacji biopolimerów ścian komórkowych zawartych w grzybni był także zależny od rodzaju preparatu enzymatycznego, czasu działania i rodzaju degradowanej grzybni (substratu). Efekt hydrolizy po 2 h był ledwie zauważalny, a nasilenie procesu nastąpiło wraz z wydłużeniem czasu. I tak po 24 h osiągnięto prawie 80%

degradacji grzybni *Trichoderma*, która była najskuteczniej degradowana przez większość preparatów (Rys. 5). W mniejszym stopniu były degradowane biopolimery ścian komórkowych grzybni *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea* (po 24 h około 30-50% wydajności procesu). Wprawdzie proces hydrolizy grzybni był obliczony na podstawie uwolnionych cukrów redukujących i większość enzymów towarzyszących brała udział w tym procesie, ale oznaczenie uwolnionej N-acetyloglukozoaminy (NAG) pozwoliło ocenić udział chitynaz w tym procesie. Największe ilości NAG (14-20 $\mu\text{mol}/150 \text{ mg S}$) były uwalniane po 24 h z grzybni *Trichoderma* pod wpływem enzymów badanych preparatów (z wyjątkiem **HD** z *T. harzianum* o najniższej aktywności chitynaz) (rys. 6A, 6B). W początkowym okresie hydrolizy, tj. po 2 h, ilość uwolnionej NAG była około 10-krotnie niższa w przypadku wszystkich preparatów (rys. 6).



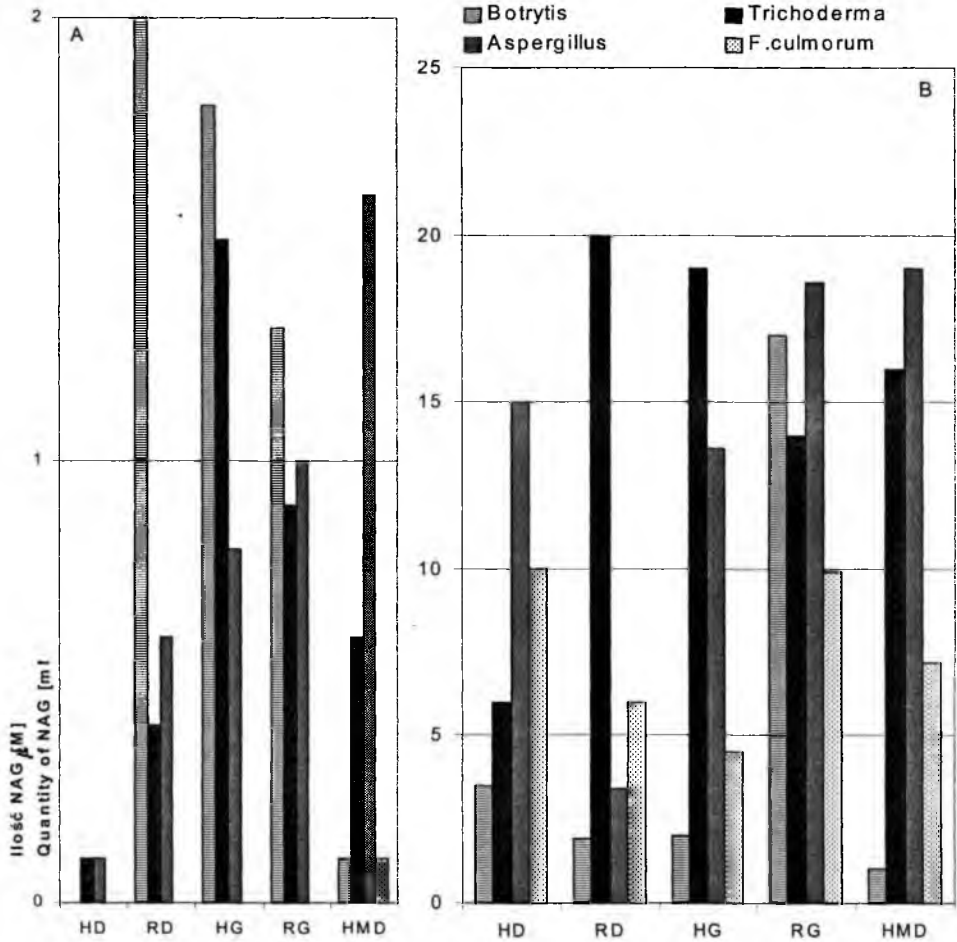
Rys. 5. Wydajność procesu hydrolizy grzybni (w przeliczeniu na cukry redukujące).

Fig. 5. Yield of hydrolysis of mycelium (in reducing sugars).

Z biopolimerów ścian komórkowych grzybni *Trichoderma reesei*, w porównaniu z grzybnią pozostałych organizmów, uwolniona także została największa ilość glukozy, która po 24 h osiągnęła wartość rzędu 18-30 mg/150 mg S i zwiększyła się ponad 40-krotnie w stosunku do pierwszego okresu hydrolizy, tj. 2 h (Rys. 4A, 4B).

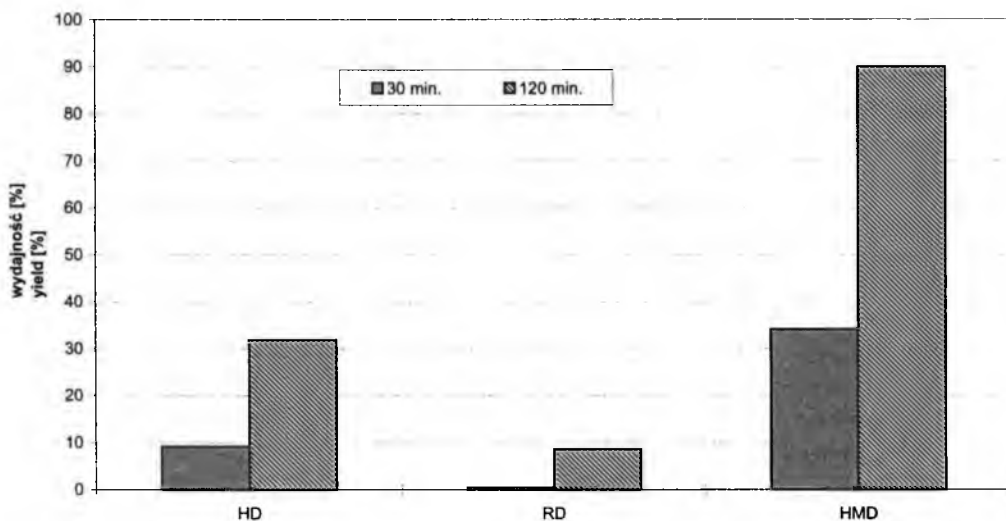
W pracy przeprowadzono także hydrolizę laminarynu, tj. polimeru glukozy połączonej wiązaniami β -1,3-glikozydowymi, z udziałem enzymów trzech preparatów (**HD**, **RD**, **HMD**). Preparat **HMD** charakteryzował się najwyższą aktywnością

β -1,3-glukanaz oraz lichenaz (Tab. 1) i był najefektywniejszy w degradacji laminarynu (po 24 h uzyskano 90% wydajności procesu). W przypadku pozostałych preparatów (HD i RD) wydajność procesu była na poziomie odpowiednio 3-krotnie i 9-krotnie niższym (Rys. 7).



Rys. 6. Ilość uwolnionej N-acetyloglukozoaminy (NAG) [μM] podczas hydrolizy 150 mg grzybni po 2 godzinach (A) i po 24 godzinach (B).

Fig. 6. Quantity of N-acetylglucosamine (NAG) [μM] released from mycelium after 2h (A) and after 24 h (B) of hydrolysis.



Rys. 7. Wydajność procesu hydrolizy laminarynu.

Fig. 7. Yield of hydrolysis of laminarin.

Wnioski

1. Badane preparaty enzymatyczne, pochodzące z hodowli wybranych szczepów z rodzaju *Trichoderma* charakteryzowały się, oprócz aktywności β -1,3-glukanaz, także aktywnościami innych hydrolaz α i β -glukanów.
2. Efektywność procesu hydrolizy badanych substratów, takich jak β -glukany drożdży piekarskich i *Y. lipolytica*, biomasa drożdży paszowych i grzybni *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum* i *Botrytis cinerea*, zależała od rodzaju preparatu enzymatycznego, jego ilości i czasu działania.
3. Najbardziej skuteczny w degradacji β -glukanów drożdży *Yarrowia* i drożdży piekarskich był preparat z *T. reesei* (RG), natomiast w degradacji wszystkich badanych rodzajów grzybni oraz laminarynu wyróżniał się preparat z *T. hamatum* (HMD).

LITERATURA

- [1] Bailey M.J., Biely P., Poutanen K.: International testing of methods for assay of xylanase activity, *J.Biotechnol.*, **23**, 1992, 257.
- [2] Mandels M., Andreotti R., Roche C.: Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6**, 1979, 17.
- [3] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 1959, 426.

- [4] Peberdy J.F.: Polysaccharase activities in lytic enzyme preparations, Training Course of fungal protoplasts fusion and its applications, Dep. Microbiol. Attila Jozsef Univ. Szeged - Hungary, 6-17 July 1981.
- [5] Pisarevskaya I.V.: Lysis of a Fungus of the Genus *Pythium* by Complexes of Enzymes Produced by Mycophylic Fungi, *Prikl. Bioch. Mikrobiol.*, **33**, 6, 1997, 616.
- [6] Rodziewicz A.: Biosynthesis of hydrolytic enzymes of UV-mutants of *Bacillus subtilis* B-3 strain, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **6/47**, 2, 1997, 63.
- [7] Rudawska M., Kamoen O.: Regulation of β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *Arboretum Kórnickie*, R 37, 1992, 51.
- [8] Santos T., Villanueva J.R., Nombela C.: Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* glucanases. *J. Bacteriol.*, **129**, 1977, 52.
- [9] Schickler H., Haran S., Oppenheim A., Chet I.: Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer, N-acetylglucosamine, *Mycol. Res.*, 1998, 102, 10, 1224
- [10] Sivan A.; Chet I.: Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, *J.Gen. Microbiol.*, **135**, 1989, Pt.3, 675.
- [11] Targoński Z., Wójcik W.: Biosynthesis of extracellular enzymes by isolates, mutants and recombinant strains of *Trichoderma spp.* *Biotechnologia*, **1** (20), 1993, 14.
- [12] Thrane C., Tronsmo A., Jensen D.F.: Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium spp.*, *Eur. J. Plant Pathol.*, **103**, 4, 1997, 331.
- [13] Torrie J.P., Senior D.J., Saddler J.N.: Production of β -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 1990, 303.
- [14] Ulhoa C.J., Peberdy J.F.: Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 1992, 236.
- [15] Witkowska D., Stempniewicz R., Maj A.: Lytic enzymes of *Trichoderma* and its utilization in yeast protoplast formation, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **8/49**, 2, 1999, 245.

STUDY ON DEGRADATION OF β -GLUCANS WITH *TRICHODERMA* EXTRACELLULAR HYDROLASES

Summary

The object of the studies was the comparison of the efficiency of *Trichoderma* enzymatic preparations in a β -glucan degradation. The hydrolytic process of substrates: yeast β -glucan (*Y. lipolytica*, baker's yeast), biomass of fodder yeast and mycelium (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Botrytis*) was conducted in pH 5,0; 50°C and in relation to quantity of enzymatic preparation and to time of process. The preparation from *T. reesei* (RG) was the most effective in degradation of β -glucan (*Y. lipolytica* and baker's yeast) and of fodder yeast biomass. The preparation from *T. hamatum* (HMD) was distinguished by degradation of examined mycelium biomass. ☒

JOANNA KAWA-RYGIELSKA

ZASTOSOWANIE METODY PCR DO RÓŻNICOWANIA DROŹDŹY PRZEMYSŁOWYCH

Streszczenie

Metoda PCR została wykorzystana do identyfikacji hybrydów drożdży przemysłowych rodzaju *Saccharomyces* z amyloolitycznym szczepem *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Zastosowanie metody pozwoliło na identyfikację trzech fuzantów międzyrodzajowych posiadających fragmenty DNA wspólne dla obu szczepów wyjściowych.

Wstęp

Metoda PCR (Polimerase Chain Reaction) została opracowana przez Kary Mullis'a w 1987 r. Polega ona na powielaniu wybranego odcinka DNA *in vitro* w łańcuchowej reakcji polimeryzacji przy użyciu polimerazy i specyficznych primerów [7].

Metoda umożliwia milionowe zwielokrotnienie (amplifikację) w ciągu kilku godzin określonego fragmentu DNA lub RNA. Reakcję PCR przeprowadza się zwykle w 25 do 30 kolejno następujących po sobie jednakowych cyklach. W każdym cyklu wyodrębnić można trzy fazy, a mianowicie: denaturację, hybrydyzację i syntezę DNA.

Denaturacja – rozdzielenie dwuniciowych cząsteczek DNA na dwie pojedyncze nici w temperaturze 95°C.

Hybrydyzacja odcinków starterowych – przyłączenie primerów do miejsc homologicznych w badanym DNA zachodzące w temperaturze około 55°C do 80°C. Utworzona struktura jest sygnałem dla polimerazy DNA do powielenia tego regionu.

Synteza DNA – powielanie wybranego odcinka DNA *in vitro* w łańcuchowej reakcji polimeryzacji w temperaturze 75°C.

Kluczowe znaczenie dla całej reakcji ma termooporny enzym polimeraza DNA izolowany z bakterii *Thermus aquaticus*. Enzym ten zachowuje aktywność i zdolność polimeryzacji po wielokrotnym ogrzaniu do temp. 95°C (temperatura denaturacji dwułańcuchowego DNA). Reakcje PCR prowadzone są w przepływowych łaźniach

powietrznych (termocyklerach), a uzyskane produkty są rozdzielane elektroforetycznie na żelach agarozowych z bromkiem etydyny.

PCR jest metodą bardzo czułą. Teoretycznie możliwe jest wykazanie obecności nawet jednej cząsteczki DNA. W praktyce przyjmuje się jednak, że dolna granica czułości to kilkanaście cząsteczek w jednym mililitrze badanego roztworu. Dzięki zaletom (szybkość i czułość) PCR znajduje coraz szersze zastosowanie: w diagnostyce medycznej, weterynaryjnej, w badaniach kryminalistycznych [1] i w badaniach żywności [4].

Cel pracy

Celem pracy była identyfikacja hybrydów międzyrodzajowych szczepów drożdży przemysłowych rodzajów *Saccharomyces* z amylopolitycznym szczepem *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 przy pomocy metody PCR.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiły drożdże; *Saccharomyces cerevisiae* V30, *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, mieszańce z grupy S (*Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 x *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) oraz mieszańce z grupy R (*Saccharomyces cerevisiae* V30 x *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086).

Badanie genomu hybrydów międzyrodzajowych metodą PCR

Matrycę DNA stanowił chromosomalny DNA badanych szczepów wyjściowych i mieszańców. Izolację DNA z komórek drożdżowych przeprowadzono wg metody Rose i wsp. [7] w modyfikacji Skąły [8]. Szczepy drożdży inkubowano w 10 cm³ pożywki YPG przez 12h w temp. 28°C z energicznym wytrząsaniem. Hodowlę wirowano (2000 obr./min. 4 min). Komórki zawieszono w 1 ml jałowej wody destylowanej i przeniesiono do probówki Eppendorfa. Zawiesinę wirowano (2000 obr./min. 1 min). Supernatant odrzucono, komórki zawieszono w 200 µl buforu do trawienia ściany komórkowej (β-merkaptioetanol – 1%, Tris-HCl-50 mM, EDTA (pH 7,5) – 25 mM, Zymolaza firmy Sigma – 5 mg/ml) i inkubowano przez 1 godzinę w temp. 37°C z okazyjnym wytrząsaniem. Dodano 200 µl roztworu do lizy (1% SDS; 0,2 M NaOH). Po wymieszaniu zawartość probówek inkubowano przez 30 min w temp. 65°C. Dodano 150 µl 5 M roztworu octanu potasu, roztwór inkubowano przez 30 min w lodzie po czym całość wirowano (14000 obr./min. 15 min, 4°C). Zebrano supernatant do nowej probówki i dodano 1 objętość zimnego (-20°C) izopropanolu, (obserwowano wytrącanie kwasów nukleinowych). Odwirowano wytrącone DNA (14000 obr./min. 5 do 10 min, 4°C), supernatant odrzucono. Osad przemyto 1 ml 70 % etanolu, wysuszono w suszarce

próżniowej z wirującym rotorem (Speedvac) firmy Savan i zawieszono w 50 μ l wody. Przechowywano w temp -20°C .

Amplifikację DNA przeprowadzono stosując primer mikrosatelitarny (GTG)₅ [6]. Syntezę primera wykonała na zamówienie niemiecka firma ARK.

Profil termiczny - PCR program (GTG)₅:

40 cykli:

93°C - 20 sek. (denaturacja dwuniciowego DNA),

50°C - 1 min (przyłączanie primera (GTG)₅),

72°C - 20 sek (powielanie homologicznych fragmentów DNA),

72°C - 6 min (powielanie DNA),

4°C - zakończenie reakcji PCR (chłodzenie).

Reakcje PCR wykonano z udziałem termostabilnej Taq polimerazy PCR firmy Quiagen oraz przy użyciu termocyklera DNA Engine PTC - 200 Peltier Thermal Cycler firmy MJ Research.

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

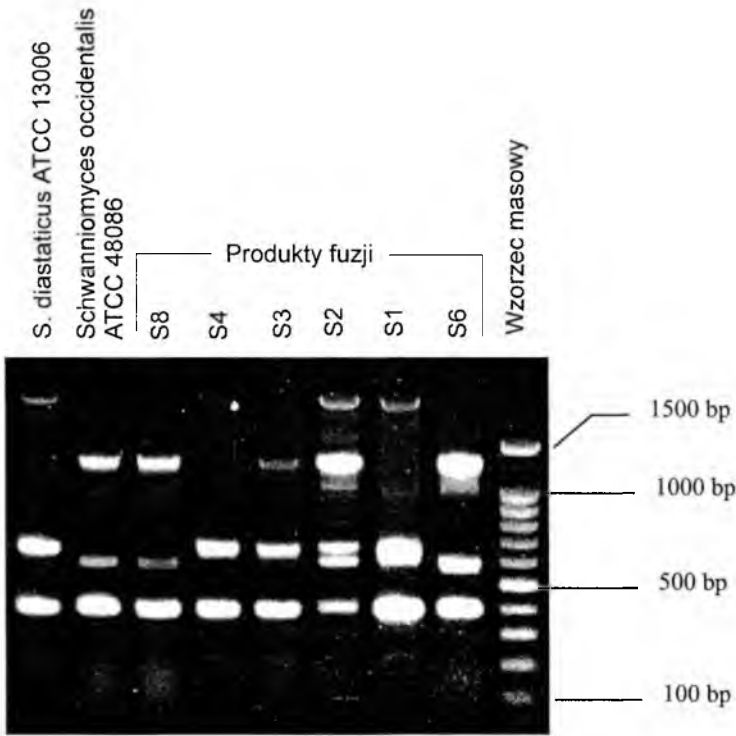
Produkty reakcji PCR oznaczono elektroforetycznie, stosując 0,8% żel agarozowy z bromkiem etydyny oraz markerem masy (100 bp DNA Ladder firmy Promega) o wielkości fragmentów 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

Rozdział DNA na żelu agarozowym rejestrowano przy pomocy telewizyjnego zestawu do rejestracji obrazu firmy Sony.

Wyniki i dyskusja

Analizując rozdział fragmentów DNA szczepów *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 i *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 oraz ich mieszańców S1, S3, S4 S6, S8 (Rys. 1) stwierdzono, że jedynie dwa szczepy S2 i S3 mogły być uznane za fuzanty. Hybryd S2 zawierał dwa fragmenty DNA (ponad 1500 bp i 675 bp) stwierdzone również w szczepie rodzicielskim *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 oraz dwa inne fragmenty (1300 bp i 600 bp) typowe dla drugiego rodzica *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. W odróżnieniu od fuzanta S2 fuzant S3 zawierał tylko po jednym regionie typowym dla każdego szczepu rodzicielskiego (675 bp) odpowiadający *Saccharomyces diastaticus* 13006 i (1300 bp) typowy dla *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Ponadto w obu hybrydach stwierdzono obecność jednego fragmentu DNA o wielkości 400 bp występującego u obu szczepów rodzicielskich. Jednoznaczne stwierdzenie, od którego z rodziców pochodzi ten fragment, wymagałoby dalszych analiz. Pozostałe produkty fuzji szczepów *Saccharomyces diastaticus* 13006 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, posiadały fragmenty DNA identyczne z

jednym z partnerów fuzji i tak mieszańce S8 i S6 z *Schwanniomyces* a S1 i S4 z *Saccharomyces*, (Rys. 1).



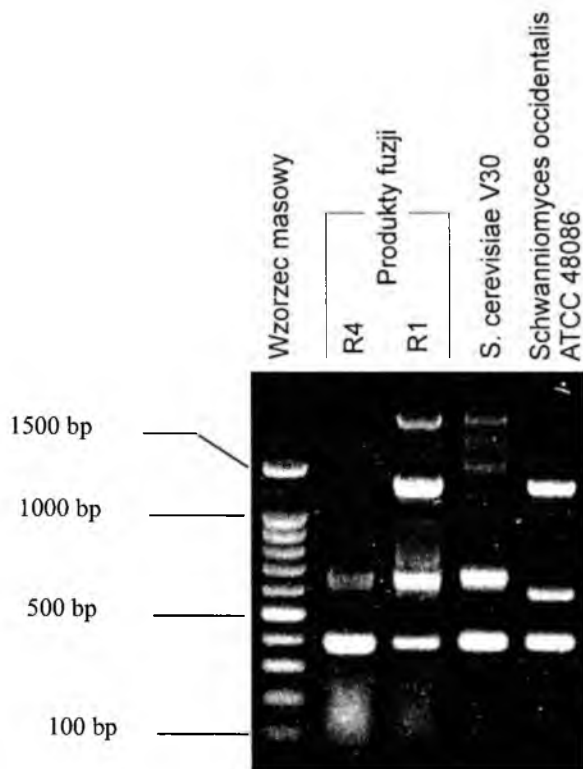
Rys. 1. Produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu primera $(GTG)_5$ dla szczepów rodzicielskich *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz produktów ich fuzji.

Fig. 1. Fingerprinting of PCR products obtained for parental strains (*Saccharomyces diastaticus* ATCC 13006 and *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) and their fusants by use of $(GTG)_5$ primer.

Wśród mieszańców R (*Saccharomyces cerevisiae* V30 x *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) zidentyfikowano obecność tylko jednego fuzanta. Hybryd R1 posiadał dwa fragmenty DNA (ponad 1500 bp i 675 bp) typowe dla szczepu *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30 oraz jeden region (1300 bp) identyczny z drugim partnerem fuzji (Rys. 2). Hybryd wyróżniał się przewagą fragmentów DNA typowych dla szczepu wyjściowego z rodzaju *Saccharomyces*. Podobnie jak we wcześniej omawianych przypadkach fuzant R1 posiadał 1 fragment o wielkości 400 bp, wspólny dla obu szczepów wyjściowych. Produkty amplifikacji genomowego DNA mieszańca R4 były

charakterystyczne tylko dla jednego szczepu wyjściowego, a mianowicie dla *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30.

Podsumowując należy stwierdzić, iż zastosowanie metody PCR i primera mikrosatelitarnego (GTG)₅ pozwoliło na zróżnicowanie partnerów fuzji w obrębie rodzaju *Schwanniomyces* i *Saccharomyces* oraz potwierdzono obecność 3 hybrydów międzyrodzajowych tych szczepów S2, S3, R1, posiadających fragmenty DNA typowe dla obu form rodzicielskich. Analiza wybranych regionów DNA pozostałych mieszańców nie potwierdziła przypuszczeń, że są one produktami fuzji szczepów *Saccharomyces* i *Schwanniomyces*. U mieszańców S8 i S6 znaleziono wyłącznie fragmenty charakterystyczne dla *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, a dla S1, S4, R4, wyłącznie fragmenty typowe dla rodzaju *Saccharomyces*. Istnieje możliwość, że do selektywnej



Rys. 2. Produkty reakcji PCR uzyskane przy użyciu primera (GTG)₅ dla szczepów rodzicielskich *Saccharomyces cerevisiae* V30 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz produktów ich fuzji.

Fig. 2. Fingerprinting of PCR products obtained for parental strains (*Saccharomyces cerevisiae* V30 and *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) and their fusants by use of (GTG)₅ primer.

amplifikacji nie udało się wybrać takich regionów DNA, które byłyby wspólne dla obu szczepów wyjściowych. Ponadto, w czasie łączenia protoplastów drożdży *Saccharomyces* i *Schwanniomyces* mogło dochodzić do tworzenia tzw. „produktów ubocznych” fuzji, których genom może składać się z kompletu chromosomów jednego ze szczepów wyjściowych oraz pojedynczego chromosomu drugiego rodzica [9].

Użyteczność primerów mikrosatelitarnych prezentowano we wcześniejszych pracach wielu badaczy. Couto i wsp., [2, 3] wykazali szczególną przydatność primera mikrosatelitarnego (GTG)₅ umożliwiającego różnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów. Inni badacze z dużym powodzeniem stosowali primery mikrosatelitarne do różnicowania szczepów w obrębie rodzajów *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* [5] czy *Debariomyces hansenii*, *Candida zeylanoides* [6].

Wnioski

1. Analiza elektroforetyczna produktów PCR, uzyskanych przy użyciu primera mikrosatelitarnego (GTG)₅, pozwoliła na różnicowanie szczepów rodzicielskich, w obrębie rodzaju *Saccharomyces* i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz na identyfikację trzech hybrydów międzyrodzajowych tych szczepów.
2. Spośród potwierdzonych genetycznie fuzantów (S2, S3, R1) na szczególną uwagę zasługuje szczep S2 wykazujący największą ilość fragmentów DNA pochodzących od obu szczepów rodzicielskich.

LITERATURA

- [1] Chmiel A: Biotechnologia - podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1998, 239-243.
- [2] Couto M., Eijmsa B., Hofstra H.: Evaluation of molecular Typing to assing genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains, Appl. Envir. Microb., **1**, 1996, 41-46.
- [3] Couto M., Hartog J., Hofstra H., van der Vossen J.: Identification of spoilage yeast in a food- production chain by microsatellite polymeraes chain reaction fingerprinting, Food Microb., **13**, 1996, 59-67.
- [4] Kur J.: Szybka diagnostyka mikrobiologiczna zanieczyszczenia żywności, w: Postępy w technologii i chemii żywności, Mat. XXVIII Sesji Nauk. KTiChŻ PAN, 1997, 1.
- [5] Lieckfeldt E., Meyer W., Bomer T.: Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting, J. Basic Microbal. **33** (6), 1993, 413-426.
- [6] Romano A., Casaregola S., Torre P, Gaillardin C.: Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debariomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese, System. Appl. Microbiol., **19**, 1996, 155-264.
- [7] Rose M.D., Winston F., Hieter P.: Methods in yeast genetics. A laboratory course manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- [8] Skała J.: Informacje personalne, 1998.
- [9] Tamaki H.: Genetic properties of abortive products resulting from the protoplast fusion in yeast, Mol. Gen. Genet, **187**, 1982, 177-179.

APPLICATION OF PCR METHOD TO DIFFERENTIATION OF INDUSTRIAL YEAST**S u m m a r y**

PCR method was used for identification hybrids industrial yeast *Saccharomyces* with amylolytic strain *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Application of this method afforded possibilities for identification of three intergeneric fusants containing DNA both parental strains. ☒

MARTA PASŁAWSKA

STAN FIZJOLOGICZNY UNIERUCHOMIONYCH KOMÓREK DROŹDŹY W CZASIE FERMENTACJI ETANOLOWEJ

Streszczenie

W pracy określano wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia oraz stężenia inokulum na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V30 w czasie okresowej fermentacji etanolowej. Stwierdzono, że stan fizjologiczny komórek zależy od wszystkich trzech badanych parametrów.

Wstęp

Popularną wśród badaczy techniką unieruchamiania drobnoustrojów jest zamknięcie komórek w matrycy polimeru, a najczęściej stosowanym polimerem jest kwas alginianowy [4, 5]. Porowata struktura żelu alginianowego umożliwia migrację substratów i produktów między biokatalizatorem a środowiskiem reakcyjnym [1, 2]. Ten sposób unieruchamiania w pewnym stopniu chroni komórki przed toksycznym wpływem środowiska [3].

W literaturze brak jest pełnych danych na temat wpływu stężenia alginianu bądź początkowej dawki inokulum na stan fizjologiczny unieruchomionych komórek drożdży. Wynika to najprawdopodobniej z bardzo dużej liczby czynników, które wpływają na żywotność komórek, co zmusza do rozpatrywania tego zagadnienia indywidualnie, tj. w odniesieniu do określonego procesu i warunków jego przebiegu.

Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu rodzaju alginianu, zróżnicowanego stężenia alginianu oraz stężenia inokulum na stan fizjologiczny komórek drożdży w czasie okresowej fermentacji etanolowej.

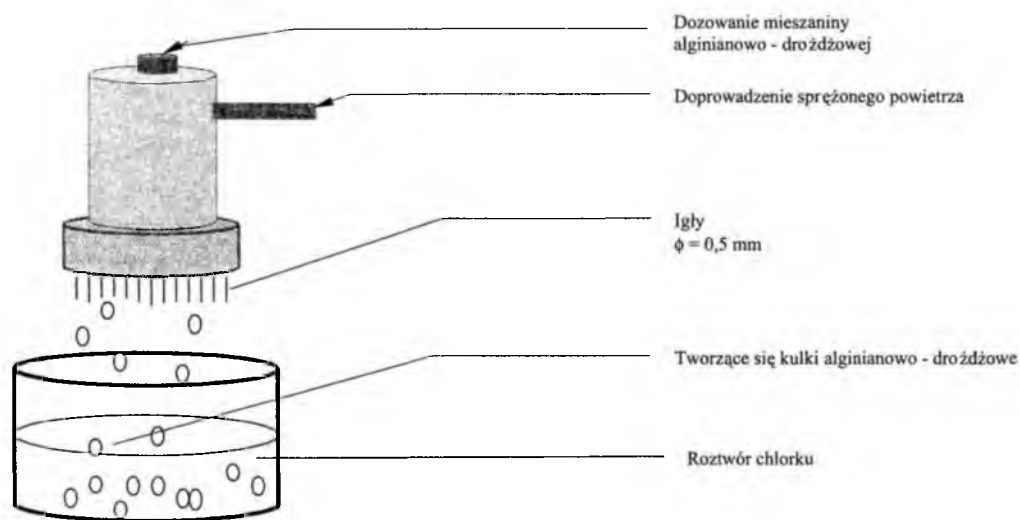
Materiał i metody badań

Surowce i materiały

Materiał biologiczny stanowiły drożdże gorzelnicze *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30 z kolekcji Katedry Technologii Rolnej i Przechowalnictwa AR we Wrocławiu. Do przygotowania zawiesiny drożdży wybrano alginian sodowy firmy Fluka Chemie. Drożdże uaktywniano poprzez prowadzenie hodowli statycznej, a następnie namnażano w hodowli wstrząsanej, stosując podłoże YM (48h, 30°C).

Unieruchamianie komórek drożdży w żelu alginianowym

Drożdże immobilizowano w alginianach: wapnia i glinu, stosując 2%, 3%, 3,75% i 4,5% roztwory alginianów przy inokulum 1, 5, 10 i 15 g_{D100}/dm³ dla każdego stężenia alginianu. Mieszaninę alginianowo-drożdżową wkraplano przy użyciu strzykawki wieloigłowej do 0,2 M roztworu chlorku wapnia oraz 0,2 M chlorku glinu w temperaturze pokojowej, przy mieszaniu chlorku mieszadłem magnetycznym. Tworzące się kulki miały średnicę ok. 2 mm (Rys. 1).



Rys. 1. Unieruchamianie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V30 w żelu alginianowym.

Fig. 1. Immobilization of yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* V30 on alginate gel.

W celu dokładnego i powtarzalnego dozowania ściśle określonej ilości drożdży każdorazowo prowadzono standaryzację inokulum, korzystając z krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność ekstynkcji od zawartości suchej masy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* rasy V30 wyrażonej w [g/dm³].

Sposób prowadzenia fermentacji

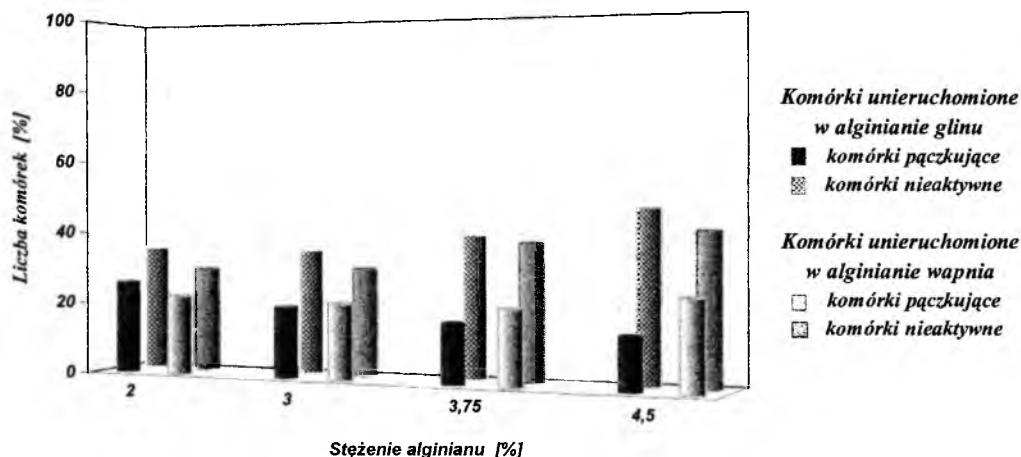
Fermentację prowadzono w temperaturze 30°C do momentu zakończenia procesu, przyjmując jako wyznacznik ilość wydzielającego się dwutlenku węgla, kontrolowaną poprzez ważenie próby tak długo, aż dwa kolejne pomiary nie różniły się więcej niż o 0,1 g. Stosowano podłoże pół-syntetyczne o wyjściowym stężeniu glukozy 10 % z dodatkiem soli: $MgSO_4$ - 0,5 g/dm³, KH_2PO_4 - 1,6g/dm³, $(NH_4)_2SO_4$ - 5g/dm³ oraz ekstraktu drożdżowego - 5 g/dm³.

Oznaczenia i obliczenia

Po zakończonej fermentacji oznaczano i porównano metodą mikroskopową stan fizjologiczny komórek, określany jako procentowy udział komórek pączkujących i nieaktywnych (komórki nieaktywne barwią się błękitem metylenowym (1:10000) na niebiesko) w ogólnej liczbie komórek.

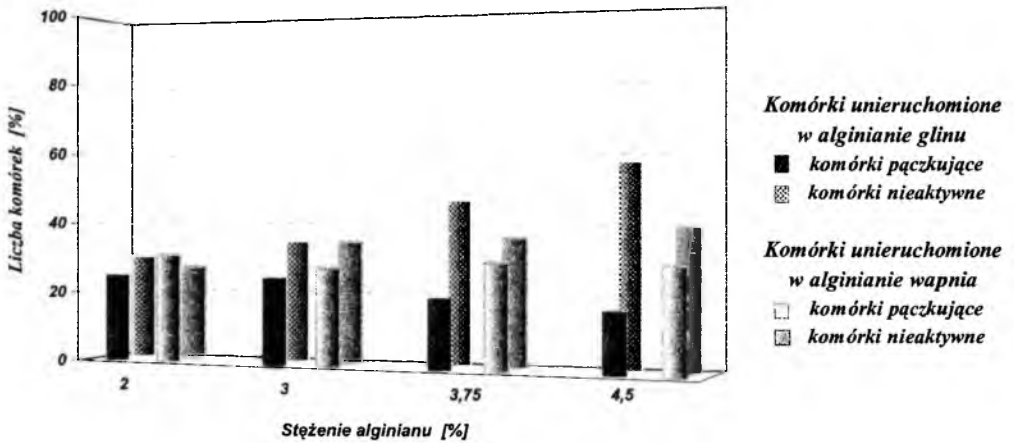
Omówienie wyników

Stan fizjologiczny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* V30 oznaczony po rozpuszczeniu kulek alginianowo-drożdżowych w cytrynianie sodu przedstawiono na rysunkach 2, 3, 4 i 5.



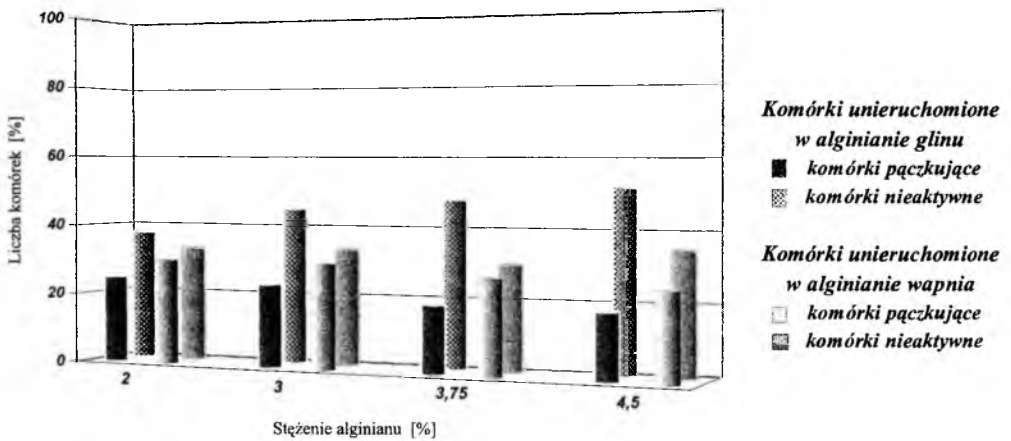
Rys. 2. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum 1 g_{D100}/dm³.

Fig. 2. Effect of Al.-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose 1 g_{D100}/dm³.



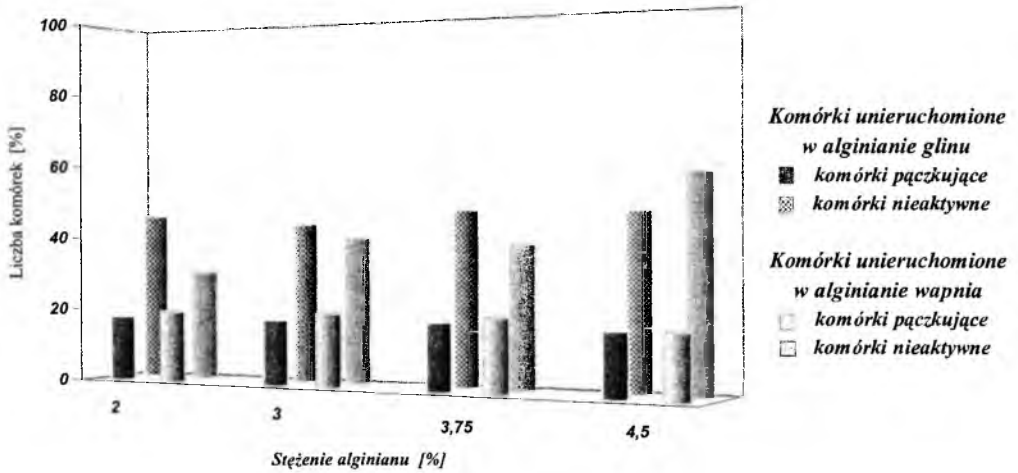
Rys. 3. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum $5 \text{ g}_{\text{D100}}/\text{dm}^3$.

Fig. 3. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose $5 \text{ g}_{\text{D100}}/\text{dm}^3$.



Rys. 4. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum $10 \text{ g}_{\text{D100}}/\text{dm}^3$.

Fig. 4. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose $10 \text{ g}_{\text{D100}}/\text{dm}^3$.



Rys. 5. Wpływ stężenia alginianu glinu i alginianu wapnia na stan fizjologiczny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przy początkowej dawce inokulum 15 g_{D100}/dm³.

Fig. 5. Effect of Al-alginate and Ca-alginate concentration on physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* cells at initial inoculum dose 15 g_{D100}/dm³.

Zaobserwowano, że w miarę zwiększania stężenia alginianu glinu stan fizjologiczny komórek się pogarszał. Liczba komórek pączkujących obniżała się od wartości 26% (liczonej jako % całkowitej liczby komórek) przy zastosowaniu do unieruchamiania 2% roztworu alginianu glinu i dawce inokulum 1 g_{D100}/dm³, do wartości 15% dla 4,5% alginianu glinu, przy inokulum 1 g_{D100}/dm³. Ilość komórek nieaktywnych była wyższa przy wyższych z zastosowanych stężeń alginianu glinu (58% komórek nieaktywnych dla 4,5% alginianu glinu i 5 g_{D100}/dm³) niż przy stężeniach niższych (30% komórek nieaktywnych dla 2% alginianu glinu i 5 g_{D100}/dm³).

W przypadku wszystkich stosowanych stężeń alginianu wapnia liczba komórek pączkujących była dość wysoka i wynosiła od 17,5% dla 4,5% alginianu wapnia i 15 g_{D100}/dm³ do 31% komórek pączkujących dla 2% alginianu wapnia i 2 g_{D100}/dm³. Liczba komórek nieaktywnych zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia alginianu wapnia (od 29% przy zastosowaniu 2% żelu i 1 g_{D100}/dm³ do 58% dla stężenia alginianu 4,5% i dawki inokulum 15 g_{D100}/dm³).

Przy zastosowaniu dawek inokulum 1 g_{D100}/dm³ i 5 g_{D100}/dm³ proces fermentacji zachodził wolniej, ale stan fizjologiczny komórek po fermentacji był lepszy niż przy wyższych początkowych stężeniach biomasy. W przypadku stężenia drożdży 5 g_{D100}/dm³ i 2% alginianu wapnia liczba komórek pączkujących wynosiła 31% a nieaktywnych 27%, przy stężeniu 10 g_{D100}/dm³ i roztworze alginianu wapnia 3% liczba komórek pączkujących wynosiła 30% a nieaktywnych 33,5%, natomiast w próbach, w których początkowa zawartość biomasy wynosiła 15 g_{D100}/dm³ przy 4,5% alginianie

wapnia, stwierdzono obecność 17,5% komórek pączkujących a nieaktywnych 58% w stosunku do całkowitej ilości komórek.

Wnioski

1. Stężenie użytych do unieruchamiania alginianów : wapnia i glinu oraz dawka inokulum wpływały na stan fizjologiczny drożdży.
2. W miarę zwiększania stężenia alginianu glinu od 2% do 4,5% stan fizjologiczny biomasy pogarszał się.
3. Zwiększanie stężenia alginianu wapnia od 2% do 4,5% nie powodowało proporcjonalnego obniżania się liczby komórek pączkujących.
4. Przy niższych z zastosowanych początkowych stężeń unieruchamianych drożdży stan fizjologiczny komórek po fermentacji był lepszy niż przy stężeniach wyższych.

LITERATURA

- [1] Bednarski W.: Zastosowanie unieruchomionych komórek drożdży w procesach fermentacyjnych, *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, **11-12**, 1987, 4-6.
- [2] Bryjak J., Noworyta A.: Charakterystyka aktywności katalitycznej acylazy penicylinowej w formie wolnej i stabilizowanej, *Mat. V Ogólnokrajowej Sesji Nauk. Postępy Inżynierii Bioreaktorowej*, Łódź 1993, 57-74.
- [3] Gilson C., Thomas A., Hawkes F.: Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilized yeasts, *Proc. Biochem. Internat.*, **6**, 1990, 104-108.
- [4] Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.: Alginate as immobilization matrix for cells, *TibTech*, **8**, 1990, 71-78.
- [5] Sroka W., Rzędowski W.: Metody unieruchamiania drobnoustrojów wykorzystywane w procesach fermentacji etanolowej, *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, **11**, 1991, 5-7.

THE PHYSIOLOGICAL STATE OF IMMOBILIZED YEAST CELLS IN ETHANOL FERMENTATION

S u m m a r y

The influence of different alginate concentration and initial yeast concentration on the physiological state of cells in ethanol fermentation were investigated. Concentration of Al-alginate, Ca-alginate and initial cell population had influence on viability of cells. ☒

DAGMARA MIERZEJEWSKA, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI

PRODUKCJA, CHARAKTERYSTYKA I ZASTOSOWANIE PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH W ANALIZIE LABORATORYJNEJ

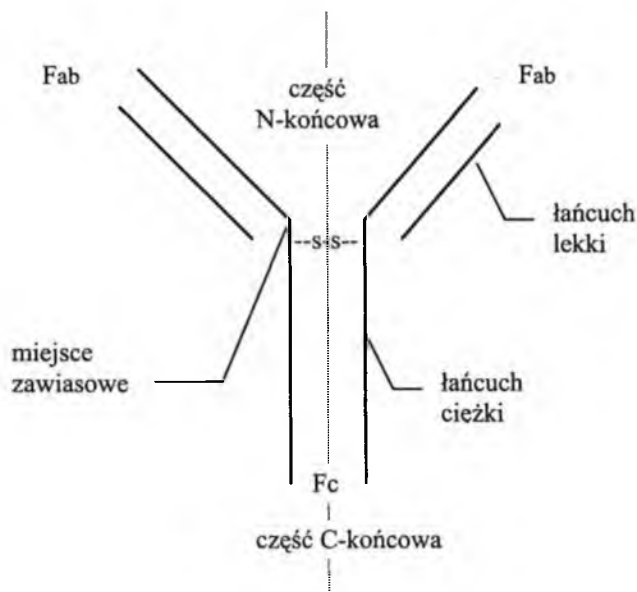
Streszczenie

Wyróżniamy dwa rodzaje przeciwciał: monoklonalne (Mab; mają zdolność swoistego rozpoznawania pojedynczego determinantu antygeny) i poliklonalne (charakteryzują się zdolnością reagowania z wieloma epitopami antygeny). Specyfika oddziaływań pomiędzy antygenem a przeciwciałem sprawia, że przeciwciała monoklonalne znajdują coraz szersze zastosowanie w analizie laboratoryjnej w medycynie, w badaniach żywności i in.

Produkcja przeciwciał monoklonalnych obejmuje szereg następujących po sobie etapów: 1-wybór antygeny, 2-wybór myszy i linii komórkowej, 3-immunizacja, 4-fuzja komórek i selekcja hybryd produkujących Mab skierowane swoiście do antygeny, 5-produkcję przeciwciał monoklonalnych *in vitro*, na dużą skalę, 6-oczyszczenie.

Wstęp

Przeciwciała są immunoglobulinami syntetyzowanymi przez układ immunologiczny po stymulacji antygenem. Wykazują aktywność swoiście skierowaną przeciwko temu antygenowi. Immunoglobuliny stanowią grupę pokrewnych białek charakteryzujących się określonymi cechami fizykochemicznymi i biologicznymi. Są wytwarzane przez komórki plazmatyczne i wydzielane do krwi lub płynów ustrojowych. Wyróżniamy pięć klas przeciwciał u człowieka: IgG (ilościowo najliczniej reprezentowana klasa w surowicy, ok.12g/l), IgA, IgM, IgD, IgE [4]. Przeciwciała posiadają dwa jednakowe fragmenty mogące wiązać antygen, tworząc z nim rozpuszczalny kompleks nie ulegający wytrąceniu. Te jednowartościowe fragmenty nazywane są Fab (ang. „*fragment antigen binding*”). Trzeci fragment nie posiada tej zdolności i nazywany jest Fc (ang. „*fragment crystalizable*”). Zaproponowany model budowy przeciwciała odpowiadający konfiguracji przestrzennej tych białek przedstawia rys. 1 [4, 8].



Rys. 1. Model budowy przeciwciała.

Fig. 1. Model of antibody structure.

Konfiguracja immunoglobulin przypomina kształt litery Y, której ramiona mogą rozwierać się do kąta 180° , dzięki obecności miejsca zawiasowego (ang. „*hinge region*”), wrażliwego na działanie pepsyny i papainy [4, 8].

F_{ab} i F_c zbudowane są z łańcuchów lekkiego i ciężkiego. Nazwy te przyjęto ze względu na ich wielkość, którą określono doświadczalnie podczas frakcjonowania na żelach [8].

Istnieją dwie teorie powstawania przeciwciał [8]:

Teoria instrukcji zakłada, że antygen działa jako informacja i jest matrycą na której standardowy, niepofałdowany łańcuch γ -globuliny jest modelowany tak, że uzyskuje wymagany kształt odpowiadający antygenowi. Częsteczka ta jest stabilizowana w tej konfiguracji przez mostki dwusiarczkowe, wodorowe i inne. Po oddzieleniu od matrycy cząsteczka zawiera miejsce swoiście wiążące się z antygenem.

Teoria selekcji zakłada, że informacja potrzebna do syntezy różnych przeciwciał jest obecna w aparacie genetycznym. Gen, który koduje swoiste przeciwciało jest wybierany przez kontakt antygeny z komórką i stymuluje syntezę odpowiednich łańcuchów peptydowych. Te z kolei ulegają spontanicznemu pofałdowaniu zależnemu od sekwencji aminokwasowej. Utworzona w ten sposób globularna konfiguracja posiada miejsce swoiście wiążące się z antygenem. Obie te teorie mają swoich zwolenników i przeciwników. Korzystając z różnorodnych technik analitycznych (autoradiografia, immunofluorescencja) próbuje się uzasadnić każdą z nich.

Immunizacja organizmu złożonymi antygenami, o wielu determinantach, powoduje wytwarzanie przeciwciał o różnej swoistości. Uzyskana w ten sposób surowica odpornościowa zawiera przeciwciała pochodzące od wielu różnych komórek plazmatycznych (jedna komórka plazmatyczna ma zdolność do produkcji tylko jednego typu przeciwciała). Surowicę tą określamy jako poliklonalną, a zawarte w niej przeciwciała nazywamy przeciwciałami poliklonalnymi.

Stosując odpowiednie technologie możemy uzyskać surowice zawierające wysoce specyficzne przeciwciała wiążące się z jednym epitopem, tzw. przeciwciała monoklonalne. Technologia produkcji przeciwciał monoklonalnych (Mab) jest dużo bardziej skomplikowana niż poliklonalnych. Zastosowanie Mab, jako narzędzia badawczego, pozwala uzyskać szereg dodatkowych informacji, najczęściej związanych z charakterystyką epitopu antygeny.

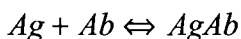
Przeciwciała monoklonalne mają zdolność swoistego rozpoznawania pojedynczego determinantu antygeny – epitopu. Sekwencja 5 lub 6 aminokwasów jest wystarczająca by go rozpoznać [2, 9]. Ta cecha przeciwciał monoklonalnych jest ich największą zaletą, gdyż podwyższa ich specyfikę oraz specyfikę oznaczeń, w których się je wykorzystuje.

Mab nie są jednak bez wad. Niektóre z nich ulegają reakcjom krzyżowym. Dlatego ważnym wyróżnikiem charakteru Mab jest ich powinowactwo do antygeny. Ze względu na tę cechę podzielono je na dwie grupy [1]:

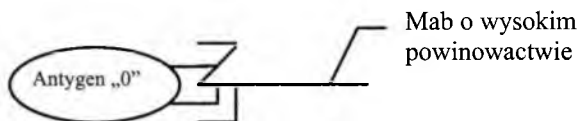
- przeciwciała monoklonalne o **wysokim powinowactwie** – epitop antygeny i przeciwciało doskonale do siebie pasują. Ten typ przeciwciał należy do grupy IgG i ma zdolność wiązania się z antygenem zawierającym nawet fragment epitopu antygeny przeciwno, któremu je wyprodukowano (rys. 2).
- przeciwciała monoklonalne o **niskim powinowactwie** – należą do klasy IgM, mają zdolność wiązania się z antygenami, których epitopy nie są podobne do epitopu antygeny, przeciwno któremu zostały skierowane (rys. 3).

Stosunek ilościowy obu tych typów Mabs w surowicy zależy ściśle od stężenia podawanego antygeny. Można przypuszczać, że kiedy odpowiednia liczba cząsteczek antygeny wiąże się z przeciwciałami receptorowymi na powierzchni komórki to limfocyt zostanie pobudzony dając klon produkujący przeciwciała. Jeśli obecna jest tylko mała ilość antygeny, wówczas jedynie limfocyty posiadające przeciwciała receptorowe o wysokim powinowactwie zdolne będą do wiązania wystarczającej ilości antygeny. Ich potomne komórki będą produkować również przeciwciała o **wysokim powinowactwie**.

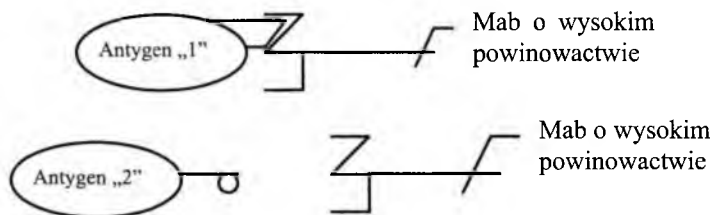
Według równania równowagi antygen (Ag) \leftrightarrow przeciwciało (Ab)



można sądzić, że gdy stężenie antygeny wzrasta, to nawet przeciwciała o względnie małym powinowactwie będą wiązać więcej antygeny. Dlatego przy wyższych stężeniach antygeny pobudzone będą również limfocyty z receptorami immunoglobulin o mniejszym powinowactwie. Takich limfocytów jest niestety dużo więcej, niż tych, z receptorami o wysokim powinowactwie.

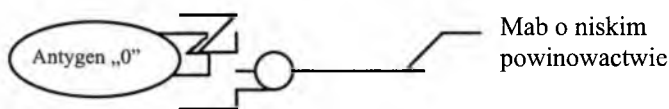


Reakcje krzyżowe Mab o wysokim powinowactwie, z dwoma niezależnymi antygenami mogą być schematycznie przedstawione w następujący sposób:

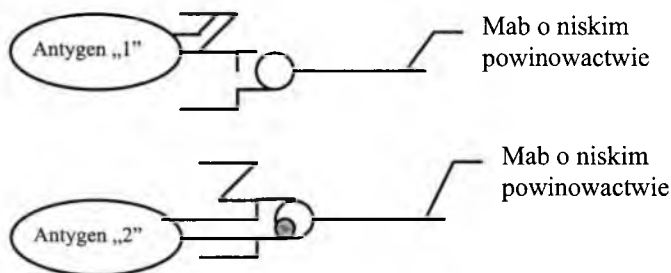


Rys. 2. Przeciwciała monoklonalne o wysokim powinowactwie.

Fig. 2. Monoclonal antibodies of high affinity.



W przypadku tych przeciwciał przebieg reakcji krzyżowych wygląda następująco:



Rys. 3. Przeciwciała monoklonalne o niskim powinowactwie.

Fig. 3. Monoclonal antibodies of low affinity.

Produkcja przeciwciał monoklonalnych

Przed przystąpieniem do właściwych prac związanych z procesem produkcji Mab należy wykonać szereg prac przygotowawczych: zapoznać się z obowiązującymi przepisami prawnymi dotyczącymi hodowli zwierząt i wykorzystywania ich do doświadczeń, zgromadzić odpowiedni sprzęt i wyposażenie laboratorium do hodowli, zapoznać się z metodyką prowadzenia hodowli zwierząt oraz prowadzenia hodowli tkankowych, rutynowych testów prowadzonych w trakcie produkcji, zasadami utrzymywania sterylności (w odniesieniu do szkła i laboratorium), zasadami dbania o swoje bezpieczeństwo itp., zapoznać się z biochemią badanego antygeny oraz fizjologią zwierząt doświadczalnych [1, 9].

Produkcja przeciwciał monoklonalnych zawiera następujące etapy (schemat 1) [1, 2, 3, 7, 9]:

a) wybór antygeny

Poziom odpowiedzi immunologicznej organizmu zależy od charakteru antygeny. Antygen o większej masie cząsteczkowej (powyżej 10 kDa), skomplikowanej budowie chemicznej i różniący się swym charakterem od białek zwierzęcia immunizowanego wywołuje silniejszą odpowiedź obronną organizmu niż mniejsze białka zwane haptunami, które wymagają wcześniejszej koniugacji z białkiem nośnikiem.

b) wybór myszy i linii komórkowej [7, 9]

Wybór myszy (lub szczura) do produkcji Mab jest zwykle ograniczony pochodzeniem linii szpiczaka. Wybraną linię komórkową szpiczaka P3X63-Ag8 wyhodowano na myszy o fenotypie Balb/C. Myszy o tym fenotypie mają stosunkowo duże śledziony, co jest dodatkowym argumentem popierającym ten wybór.

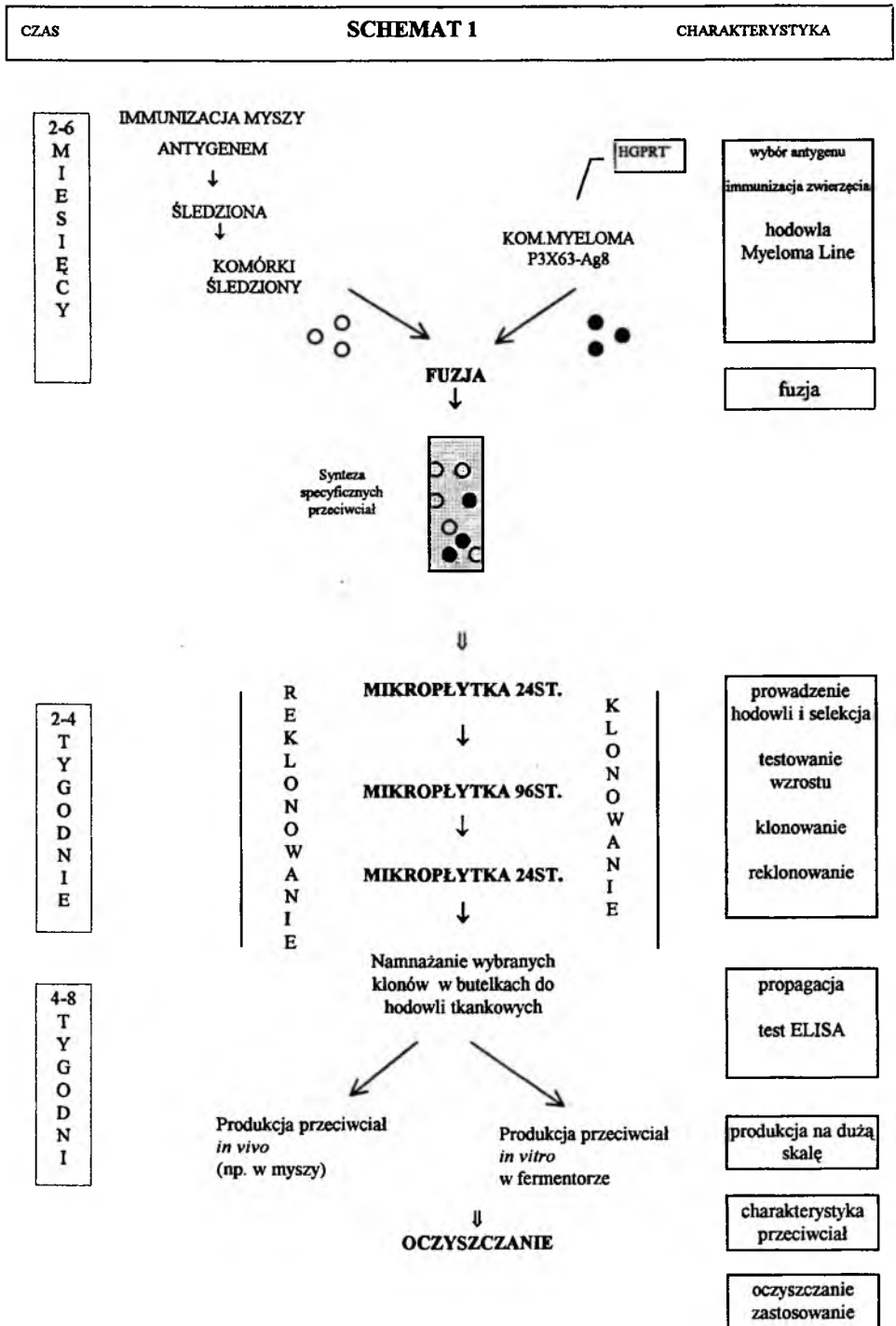
Plasmocytoma X63, linii szpiczaka P3X63-Ag8, produkuje pełną sekwencję IgG1. Komórki X63 poddawane fuzji mogą wzrastać przy niskiej gęstości komórek, co jest dużym ułatwieniem przy klonowaniu hybryd.

c) immunizacja

Immunizacja zwierzęcia odbywa się dwuetapowo według określonych protokołów: dawka wstępna (z reguły maksymalna ilość antygeny tzn. 100 µg/mysz) i kilkakrotne doszczepianie (10–50 µg/mysz) [7]. Przyjmuje się, że najlepszym miejscem immunizacji wstępnej jest jama otrzewnowa (wówczas antygen stymuluje działanie limfocytów śledziony).

Inne rodzaje szczepień to:

- podskórne – stymuluje działanie węzłów chłonnych,
- w łapkę – może powodować zapalenie i obrzmienie, co jest męczące dla zwierzęcia,



- śródskórne, domięśniowe – mogą zakończyć się owrzodzeniem zagrażającym życiu,
- bezpośrednio do śledziony – trudne do przeprowadzenia, może spowodować śmierć zwierzęcia,
- dożylnie – trudne do przeprowadzenia, może spowodować śmierć zwierzęcia, zalecane jedynie w szczególnych przypadkach podczas doszczepiania przed fuzją [7].

d) fuzja komórek i pasażowanie [1, 2, 9]

Zawiesina komórek śledziony (określona liczba komórek/ml medium) i szpiczaka poddawana jest fuzji i wysiewana na mikroplytkach o 96 studzienkach. W roztworze po fuzji znajdują się cztery rodzaje komórek:

- komórki szpiczaka, które nie uległy fuzji (kancerogeny),
- komórki śledziony, które nie uległy fuzji,
- nieprawidłowe komórki hybryd,
- hybrydy produkujące przeciwciała monoklonalne.

Głównym celem tego etapu badań jest wyselekcjonowanie z mieszaniny komórek populacji hybryd produkujących Mab, skierowanych swoiście przeciwko stosowanemu antygenowi.

Komórki szpiczaka charakteryzują się defektem enzymatycznym objawiającym się brakiem kinazy tymidyny (TK) lub hypoksantyno-guanino-fosforylo transferazy (HGPRT), co uniemożliwia im syntezę zasad purynowych, a w rezultacie syntezę DNA i RNA. Wysiew komórek na selektywne podłoże, np. z dodatkiem aminopteryny, powoduje ich śmierć. W tych warunkach giną również pozostałe komórki śledziony i źle utworzone hybrydy [7].

Hybrydy produkujące Mab, wykorzystując dużą żywotność komórek nowotworowych i zdolność syntezy RNA i DNA komórek śledziony, przeżywają. W ten sposób po ok. 2 tygodniach uzyskuje się względnie specyficzne klony produkujące przeciwciała monoklonalne. Specyficzność, wyprodukowanych przez hybrydy Mab, do antygeny sprawdzana jest testem ELISA. Wartość absorbancji jest miarą zarówno ilości jak i jakości wyprodukowanych przez poszczególne klony hybryd. Wybierając te o największym powinowactwie do antygeny pasażuje się je na płytkach 24 studzienkowych, a następnie w butelkach hodowlanych w celu zwiększenia skali hodowli.

Wzrost i jakość hybryd w całym procesie produkcyjnym kontrolowany jest metodą indirect i direct ELISA. Co pewien czas, w momencie maksymalnego wzrostu, zamraża się część hodowli tworząc w ten sposób bank komórek.

Produkcję w skali „makro” możemy prowadzić w specjalnych bioreaktorach typu „hallow fiber”. Przykładem takiego bioreaktora jest CELLMAX. Urządzenie to zawiera specjalne nośniki wiążące hybrydy na swojej powierzchni. Przeciwciała produkowane są w ciągłym przepływie medium, dzięki czemu można zminimalizować zużycie

surowicy krwi oraz uzyskać większe stężenie przeciwciał na jednostkę objętości niż tradycyjną metodą hodowli.

Uzyskanie supernatantu zawierającego Mab jest zazwyczaj etapem wystarczającym do zastosowania ich jako narzędzia badawczego. W zależności od późniejszego zastosowania Mab czasem zachodzi potrzeba zagęszczenia i oczyszczenia uzyskanego supernatantu (pozostałości FCS, czerwieni fenolowej). Ujednoliconą surowica używana jest do oznaczania wyjściowego antygeny.

Oczyszczanie przeciwciał monoklonalnych

W niektórych oznaczeniach substancje, jak np. białko surowicy krwi, dodawane w trakcie hodowli Mab mogłyby interferować z reagentami i fałszować wyniki. Dlatego czasem zachodzi konieczność oczyszczania przeciwciał. Zastosowanie Mab w medycynie klinicznej (ewentualny kontakt z człowiekiem) stawia dodatkowe wymagania względem ich czystości tzn. powinny one być wolne od toksyn, pyrogenów i antygenowych substancji [5, 9].

Przed wyborem techniki oczyszczania należy ustalić czy etap ten jest potrzebny, jeśli tak to w jakim stopniu powinien być oczyszczony produkt finalny. Przy wyznaczaniu kryteriów stopnia oczyszczania warto mieć na uwadze [3]:

- oszczędność czasu, zużycie pracy i materiałów w przypadku niepotrzebnego oczyszczania,
- uwzględnić metody, które pomimo że są mniej specyficzne i dają „gorszy” produkt niż inne, jednocześnie są szybsze, tańsze a produkt końcowy ma klasę czystości wystarczającą do prowadzonych analiz.

Ważnym elementem jest również źródło Mab tzn.[5]:

- Mab pochodzenia *in vivo*- produkowane przez hybrydy wzrastające w organizmie zwierzęcia. Uzyskane Mab zawieszane są w płynie owodniowym. Ich koncentracja wynosi 1-15mg/ml zawiesiny. Obok nich w płynie zawartych jest wiele innych białek żywiciela, lipidów i komórek obumarłych. Białka żywiciela stanowią problem, gdyż zawierają dużo albuminy, transferyny i immunoglobulin bardzo podobnych do przeciwciał monoklonalnych. Problem stanowią tu również enzymy proteolityczne, które mogą uszkodzić produkt finalny. W takim przypadku oczyszczanie jest procesem niezbędnym.
- Mab produkowane *in vitro* przez komórki hybryd hodowanych na odpowiednim podłożu w bioreaktorze. Mab zawieszane są w supernatancie. Ich stężenie jest dużo mniejsze niż w przypadku hodowli *in vivo* i zawiera się w granicach 0,01-0,5 mg/ml supernatantu. Głównym źródłem zanieczyszczeń jest woda. Obok przeciwciał supernatant zawiera znaczne ilości obcych białek (np. z FCS) i zanieczyszczeń

jak np. czerwień fenolowa (wskaźnik pH podłoża). Wskaźnik silnie adsorbuje się na podłożu chromatograficznym i nie wymaga specjalnych zabiegów usuwania.

- Mab pochodzenia *in vitro*- hodowane w specjalnych reaktorach „hollow fiber”. Dzięki takiej technice są one bardzo skoncentrowane, powyżej 10 mg/ml zawiesiny. Nie zawierają żadnych lipidów. Towarzyszące przeciwciałom zanieczyszczenia pochodzą jedynie z podłoża. Są to resztki białek FCS, czerwień fenolowa, albumina, transferyna, wołowe IgG i woda. Jakkolwiek są one obecne w dużo mniejszym stężeniu niż w dwóch powyższych przypadkach.

Oczyszczanie przeciwciał jest zazwyczaj procesem wieloetapowym i składa się z następujących etapów [2, 5, 9]:

a) przygotowanie próby

Etap ten ma na celu przygotowanie próby do dalszego oczyszczania wykorzystującego techniki chromatograficzne.

Obejmuje on:

- usunięcie, przez wysolenie, większych ilości białka pochodzenia źródłowego;
- usunięcie specyficznych zanieczyszczeń jak lipoproteiny, czerwień fenolowa;
- wymianę buforu.

Najpopularniejszym sposobem wysalania jest **wysalanie siarczanem amonowym**. W metodzie tej wykorzystywane jest selektywne wytrącanie różnych frakcji białek w próbce. Siarczan amonowy jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie, redukuje zawartość lipidów, stabilizuje większość białek w roztworze (niektóre Mab mogą ulec denaturacji). Jest doskonałym krokiem wstępnym przed zastosowaniem hydrofobowych interakcji chromatograficznych w dalszych etapach oczyszczania. Metoda ta pozwala na usunięcie 50% białek zanieczyszczających produkt.

Technika wysalania siarczanem amonowym jest etapem czasochłonnym i nie nadaje się do użycia w skali preparatywnej.

Klarowanie polega na usunięciu resztek nierozpuszczonych białek i substancji, które mogłyby zanieczyścić kolumny w dalszych etapach oczyszczania. Bardzo popularną metodą klarowania jest wytrącanie siarczanem dextranu lub poliwinylolipirolidyną (PVP).

Wymiana buforu i odsalanie jest przydatne przy przygotowywaniu próby przed kolejnymi etapami oczyszczania chromatograficznego. W porównaniu z innymi metodami wymiany buforu (dializa) filtracja żelowa jest stosunkowo wygodna i łatwo ją przystosować do różnych warunków. Filtracja żelowa, np. przy użyciu żeli Sephadex służy głównie do oddzielania dużych molekuł białek (np. immunoglobuliny) od małych peptydów, soli i innych rozpuszczalnych składników pochodowlanych.

b) oczyszczanie główne

Etap ten jest najbardziej krytyczny i efektywny dla całego procesu oczyszczania. Uwzględnia się w nim specyfikę wyprodukowanych Mab i właściwości pozostałych zanieczyszczeń. Wybór sposobu przygotowania próby jest ściśle związany z tym etapem.

Zazwyczaj uwzględnia się następujące dane:

- właściwości Mab: ich rozmiar, ładunek, pI, stabilność, hydrofobowość, powinowactwo do nośników Protein A lub G, i innych,
- właściwości pozostałych po wysoleniu zanieczyszczeń,
- możliwość dostępu do odpowiedniego sprzętu i medium,
- dostęp do czystego antygenu,
- skala oczyszczenia,
- preferencje (możliwości i umiejętności) pracownika.

W zależności od tych elementów korzystamy z następujących metod chromatograficznych:

Chromatografia powinowactwa

Chromatografia powinowactwa polega na specyficznej i odwracalnej adsorpcji oczyszczanych białek przez substancję wiążącą (ligand), kowalencyjnie połączoną z nierozpuszczalną matrycą nośnika. Próba zawierająca przeciwciała monoklonalne jest nanoszona na kolumnę i w odpowiednich warunkach Mab wiążą się z ligandami. Niezwiązane związki są wymywane. Po zmianie buforów wymywających Mab (IgG) są uwalniane. W chromatografii powinowactwa najczęściej stosowanym złożem przy oczyszczaniu Mab pochodzenia *in vivo* jest Protein A.

Chromatografia jonowymienna

W chromatografii jonowymiennej wykorzystuje się różnice w ładunku elektrycznym molekuł. Składniki naniesionej na kolumnę próby wiążą się z fazą stałą podłoża kolumny z różną siłą. Zmieniając stężenie soli i pH eluentu regulowana jest siła wiązania do podłoża, powodując w ten sposób elucję różnych rodzajów białek w różnym czasie. Ten rodzaj chromatografii, zarówno aniono- jak i kationowymiennej, jest bardzo popularny przy oczyszczaniu Mab. Technika ta jest szczególnie przydatna przy rozdziale monoklonalnych IgG od IgG żywiciela (wynika to ze zróżnicowania ładunków tych białek). Jest to również doskonała technika do oczyszczania surowicy poliklonalnej. Zapewnia ona efektywną koncentrację przeciwciał w połączeniu z wysokim stopniem rozdziału.

Złoża stosowane na tym etapie to najczęściej:

- wymiennicze anionowe – Mono Q, Q Sepharose High Performance,
- wymiennicze kationowe – Mono S, SP Sepharose High Performance, Hydroxyapatite (forma fosforanu wapnia).

Mineralny wymiennicz kationowy jest ostatnio szeroko używany w biochemii mimo, że dotychczas nie są znane zasady mechanizmu absorpcji w chromatografii hydroxyapatytowej.

c) dalsze oczyszczanie [5]

Jeżeli poziom czystości produktu po pierwszych dwóch etapach jest niewystarczający nieodzowna jest jego dalsza obróbka. Na tym etapie korzysta się w dalszym ciągu z technik chromatograficznych: filtracji żelowej, HIC [hydrophobic interaction chromatography], – łatwa i efektywna metoda, i chromatografii jonowymiennej.

Filtracja żelowa

Rozdział molekuł uwarunkowany jest ich rozmiarem. Metoda ta używana jest najczęściej na zakończenie procesu rozdziału bądź jako metoda odsalania pomiędzy kolejnymi etapami oczyszczania.

Wymienionej techniki używa się do usunięcia zanieczyszczeń o zbliżonym ładunku do IgG Mab, zwykle częściowo usuniętych w pierwszym etapie przy użyciu kolumny jonowymiennej lub powinowactwa. Filtracja żelowa jest szczególnie przydatna do usuwania transferyny, którą trudno usunąć inną techniką. Filtracja żelowa doskonale sprawdza się przy usuwaniu dimerów, tetramerów i agregatów. Często używa się ją do odsalania lub wymiany buforu przed przechowywaniem finalnego produktu. Najczęściej stosowane złoża to: Sephadex G-25, PD-10, Sephacryl S-200 High resolution, Superdex 200.

Chromatografia wykorzystująca interakcje hydrofobowe (HIC)

Metodą chromatografii interakcji hydrofobowych rozdziela się biomolekuły wykorzystując różnice w ich hydrofobowości. Jest to technika alternatywna do pozostałych pod warunkiem, że Mab są stabilne przy wysokim stężeniu soli. Metodę HIC korzystnie można zastosować po wytrącaniu siarczanem amonowym, po którym próba zawiera duże stężenie soli. Technikę HIC można stosować pojedynczo lub w układzie szeregowym z filtracją żelową lub chromatografią jonowymienną. Metoda ta jest komplementarna do technik rozdziału opartych na rozmiarze lub ładunku biomolekuły.

Wszystkie IgG są hydrofobowe, chociaż istnieją wyjątki nawet wśród Mab z tej samej klasy. Ta cecha pozwala HIC w dużym stopniu usunąć IgG żywiciela. Najczęściej stosowane złoża to: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Alkyl Superose.

Opisany trzystopniowy sposób oczyszczania przeciwciał jest typowy dla technologii oczyszczania przeciwciał monoklonalnych. Ilość etapów zależy jedynie od wymaganej klasy czystości produktu końcowego.

Zastosowanie

Wysoka specyficzność przeciwciał monoklonalnych w stosunku do antygeny, rozwój technologii produkcji Mab i eliminacja udziału zwierząt, spowodowały, że

zaczęły one konkurować z powszechnie stosowanymi do tej pory w analityce przeciwciałami poliklonalnymi.

Szczególnie szerokie zastosowanie znalazły one w diagnostyce immunologicznej i immunohistologicznej. Mab stosuje się w testach diagnozujących AIDS do badania proporcji komórek limfocytów pomocniczych T i T-supresorowych, co pomaga monitorować postęp tej choroby. Mają one ustalone miejsce w immunohistologicznym diagnozowaniu chorób rozrostu limfy i nowotworów [1, 7].

Nie bez znaczenie jest wykorzystanie technik immunometrycznych (z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych) w analizie żywności. Przydatne okazały się one w odróżnianiu gatunków mięsa w surowych, nieprzetworzonych produktach mięsnych. Mięso o podobnej pigmentacji, np. wołowina i konina, wołowina i baranina, mięso drobiowe i wieprzowe, są po zamrożeniu (szczególnie w dużej masie) wizualnie trudne do rozróżnienia. Wiele produktów mięsnych, jak kiełbasy, burgery, kotlety mielone są mieszaniną wielu gatunków mięs. To właśnie techniki immunometryczne stwarzają możliwość szybkiego oznaczenia zarówno jakościowego, jak i ilościowego składu poszczególnych produktów [6]. Techniki te pozwalają również z dużą dokładnością oznaczyć zawartość białek soi w produktach mięsnych. Kolejne przykłady zastosowania Mab w analizie żywności przedstawiają Morris B.A. i Clifford M.N. [6], np.:

- oznaczanie zafałszowań mleka krowiego mlekiem kozim i odwrotnie,
- oznaczanie denaturacji białek mleka (Białka mleka wywołują alergie u niemowląt i dzieci. Istnieje teza, że obróbka cieplna redukuje właściwości immunogenne tych białek. Metody immunometryczne pozwalają dokładnie określić poziom immunoreaktywnych białek w mleku przed i po obróbce, co pozwala *in vitro* określić wpływ poszczególnych procesów na immunoreaktywne właściwości białek mleka.),
- oznaczanie amyloglukozydazy w piwie,
- oznaczanie ochratoksyn w żywności (Ochratoksyny są toksycznym produktem metabolizmu niektórych grzybów, jak np. *aspergillus*, występujących jako naturalne zanieczyszczenie artykułów rolnych, syntetyzowanym podczas np. nieprawidłowego przechowywania. Ochratoksyny znajdują się w kukurydzy, owsie, pszenicy, jęczmieniu, orzechach, produktach wytworzonych na bazie ziaren np. pasze.),
- oznaczanie zanieczyszczeń i dodatków do żywności (bardzo istotne w kontrolowaniu jakości żywności).

Powyższe przykłady wykorzystania metod immunometrycznych w analizie żywności to jedynie kilka powszechnie stosowanych w laboratoriach analitycznych. Fakt rozwoju technik produkcji przeciwciał monoklonalnych tzn. otrzymywanie coraz bardziej wyspecjalizowanych fragmentów łączących się ze ściśle określonym epitopem, pozwala na coraz szersze stosowanie tych metod ze względu na zwiększenie ich precyzyjności i dokładności, oraz oznaczania coraz to większej liczby antygenów w żywno-

ści. Powoduje to również wzrost dostępnych na rynku gotowych, precyzyjnych testów immunometrycznych oferowanych przez firmy handlowe (np. SIGMA – ALDRICH: E.coli O157 TECRA[®], Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Progesterone i inne).

Słownik terminów immunologicznych

Antygen – substancja charakteryzująca się a) immunogennością czyli zdolnością do wywoływania odpowiedzi immunologicznej organizmu, b) antygennością czyli zdolnością do łączenia się z immunoglobulinami.

Determinanty antygenowe – obszary molekularne antygeny, które wiążą się ze swoistym przeciwciałem.

Epitop – determinant antygenowy o znanej strukturze.

Hapten – substancja o niskim ciężarze molekularnym, samodzielnie nie wykazująca właściwości immunogennych; po połączeniu z nośnikiem zyskuje cechy antygeny.

Immunogen – substancja obca dla organizmu wywołująca jego reakcję obronną, w której uczestniczą limfocyty i wytworzone przeciwciała.

Przeciwciała – białka z grupy immunoglobulin wytwarzane przez organizm uczestniczące w czynnościach odpornościowych organizmu; w zależności od budowy ciężkich łańcuchów wyróżnia się pięć klas immunoglobulin IgA, IgG, IgM, IgD, IgE.

Przeciwciała monoklonalne – przeciwciała otrzymane z pojedynczego klonu limfocytu, wyprodukowane w wyniku fuzji komórek śledziony immunizowanej antygenem myszy z komórkami szpiczaka.

Przeciwciała poliklonalne – przeciwciała wyprodukowane przez limfocyty na skutek immunizacji zwierzęcia antygenem.

LITERATURA

- [1] Campbell A.M.: Monoclonal antibody and immunosensor technology, Elsevier Science Publishers B.V., 1991.
- [2] Harlow E., Lane D.: Antibodies. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- [3] Liddell J.E., Cryer A.: Monoclonal antibodies, John Wiley & Sons Ltd., 1991.
- [4] Mackiewicz St.: MM Immunologia, PZWL, Warszawa, 1986.
- [5] Monoclonal antibody purification, Handbook – including Mab Assistant, Pharmacia, 1986.
- [6] Morris B.A., Clifford M.N.: Immunoassays in Food Analysis, Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1985.
- [7] Peters J.H., Baumgarten H.: Monoclonal antibodies, Springer – Verlag, 1988.
- [8] Roitt I.M.: Podstawy immunologii, PWN, Warszawa, 1977.
- [9] Tijssen P.: Practice and theory of enzyme immunoassays in laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology, Elsevier Science Publishers B.V., 1985.

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN LABORATORY ANALYSIS

S u m m a r y

There are two kinds of antibodies employed in food analysis: **monoclonal antibodies** (Mab) characterized by unique specificity and an extremely high selectivity for the epitope, and **polyclonal antibodies** characterized by different specificity and affinity. Due to their specificity monoclonal antibodies are good analytical tools and more frequently employed in medicine or food analysis.

Production of monoclonal antibodies is carried out during the following stages: 1) antigen selection, 2) mouse and cell line selection, 3) cell fusion, 4) culture and hybridoma selection, 5) Mabs production bulk, 6) purification. ✕

ANETA WIDERA

CHARAKTERYSTYKA JAKOŚCIOWA SKROBI I WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNYCH CIASTA Z MĄKI RÓŻNYCH ODMIAN JĘCZMIENIA JAREGO

Streszczenie

Badano ziarno 5 odmian jęczmienia jarego: Rodos, Rambo, Boss, Rodion, Rabel ze zbioru w 1997 roku. Stwierdzono, że odmiany jęczmienia różniły się wyrównaniem ziarna, wydajnością mąki i zawartością białka ogółem. Wykazano, że oceniane odmiany charakteryzują się niską aktywnością alfa-amylazy mierzoną liczbą opadania. Ziarno różnych odmian jęczmienia mało różniło się zawartością skrobi. Mąka jęczmienna odznaczała się wysoką początkową i końcową temperaturą i długim czasem kleikowania oraz dużą lepkością maksymalną kleików. W czasie przetrzymywania przez 30 minut w stałej temperaturze skrobia ulega rozpadowi, a w czasie chłodzenia amyloza łatwo retrograduje. Badana mąka jęczmienna charakteryzuje się dużą wodochłonnością. Ciasto jęczmienne odznacza się niskimi właściwościami reologicznymi.

Wstęp

Zboża stanowią podstawę odżywiania szerokich mas społeczeństwa (pieczywo, ryż, kasze, makarony). W ostatnich latach obserwuje się zwiększone zainteresowanie jęczmieniem, który uważany jest za zboże paszowe. Tylko część jęczmienia przeznaczana jest na słód, a niewielki procent wykorzystywany jest w żywieniu ludzi – są to głównie kasze, a w przeszłości chleb plackowy [13]. Obecnie poszukuje się możliwości urozmaicenia żywności oraz zwraca się uwagę na zdrowe i racjonalne żywienie. Jęczmień – najstarsze zboże w historii – jest ponownie odkrywany ze względu na niedocenianą dotychczas wartość fizjologiczno-żywnościową.

Atrybutem jęczmienia jest duża zawartość białka [16, 9] o wysokiej wartości odżywczej uwarunkowanej składem aminokwasowym [16]. Jęczmień zawiera więcej aminokwasów egzogennych (ok. 36%) niż pszenica i żyto (33%) [11]. Wśród składników węglowodanowych dominuje skrobia. Zawartość skrobi w ziarnie jęczmienia może wynosić średnio 64% [19]. Znaczenie żywieniowe skrobi wynika ze stosunku

amylozy do amylopektyny [16]. Amyloza jest trudniej trawiona niż amylopektyna. Skrobia jęczmienna może zawierać: 0% (jęczmień woskowy), 25% (jęczmień normalny) i 40% amylozy (jęczmień wysokoamylozowy). Z czego wynika zróżnicowana strawność skrobi jęczmiennej – 69–84%, niższa w porównaniu do innych zbóż – ok. 95% [11].

Ważnymi składnikami są także węglowodany nieskrobiowe – β -glukany i pentozy – wchodzące w skład włókna pokarmowego. β -glukany nie są trawione w przewodzie pokarmowym człowieka, wywierają one wpływ na poziom cholesterolu [10] i glukozy [20] w surowicy krwi. Frakcja rozpuszczalna β -glukanów może być skutecznym czynnikiem hipoglikemicznym i hipocholesterolemicznym w diecie człowieka [16]. Jęczmień zawiera od 3 do 7,2% [4], średnio 5% β -glukanów [20].

Istotny wpływ na wartość technologiczną i przydatność ziarna do produkcji ma jego skład chemiczny. Zbadanie go umożliwi dostosowanie parametrów procesu przetwórczego tak, by uzyskać produkt najwyższej jakości. Poznanie wartości ziarna odmian jęczmienia uprawianego w Polsce, zwłaszcza niektórych wyznaczników, pozwoli na właściwe jego przeznaczenie przetwórcze.

Celem pracy była ocena wartości przemiałowej, zawartości białka, aktywności amylolytycznej i jakości skrobi oraz określenie właściwości reologicznych ciasta z mąki jęczmiennej.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy stanowiło ziarno pięciu odmian jęczmienia jarego (Rodos, Rambo, Boss, Rodion, Rabel) ze zbioru w 1997 roku, uzyskane ze Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Rarwinie.

Wykonano oznaczenia wyrównania ziarna [21]. Ziarno śrutowano w młynku typ WŻ-1. Mąkę do badań otrzymano z przemiału ziarna w młynie Quadrumat Junior [5]. 20 godzin przed przemiałem ziarno nawilżono do 12,5% wilgotności. Zawartość białka ogółem oznaczono metodą Kjeldahla ($N \times 6,25$), a zawartość skrobi metodą enzymatyczną [15]. Aktywność α -amylazy określono pośrednio, oznaczając liczbę opadania metodą Hagberga-Pertena. Właściwości reologiczne ciasta jęczmiennego oznaczono za pomocą farinografu Brabendera. Farinogramy wyceniono metodą AACCC [1]. Jakość skrobi określono amylograficznie [5]. Do hamowania aktywności α -amylazy stosowano 200 mg octanu rtęciowego. Zawartość białka ogółem oznaczono w ziarnie i w mące, zawartość skrobi i liczbę opadania w ziarnie, a właściwości reologiczne ciasta i jakość skrobi w mące.

Wyniki i dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że ziarno jęczmienia charakteryzuje się dużym wyrównaniem (tab. 1). Wyrównanie ziarna większości odmian wahało się od 92,0 do 94,3%. Najmniejsze wyrównanie miało ziarno odmiany Rodos (89,2%).

Z badań Bhattya [2, 3, 5], Subdy i wsp. [17] oraz własnych (tab. 1) wynika, że wydajność mąki z ziarna zależy od rodzaju stosowanego młyna. W obecnych badaniach (tab. 1) wykazano, że z przemiału ziarna odmian jarych w młynie Quadrumat Junior można otrzymać od 32,7 do 37,3% mąki. Najmniejszą ilość uzyskano z ziarna odmian Rabel (32,7%) i Rambo (33,0%), a znacznie więcej z odmian Rodion (36,7%) i Boss (37,3%).

Tabela 1

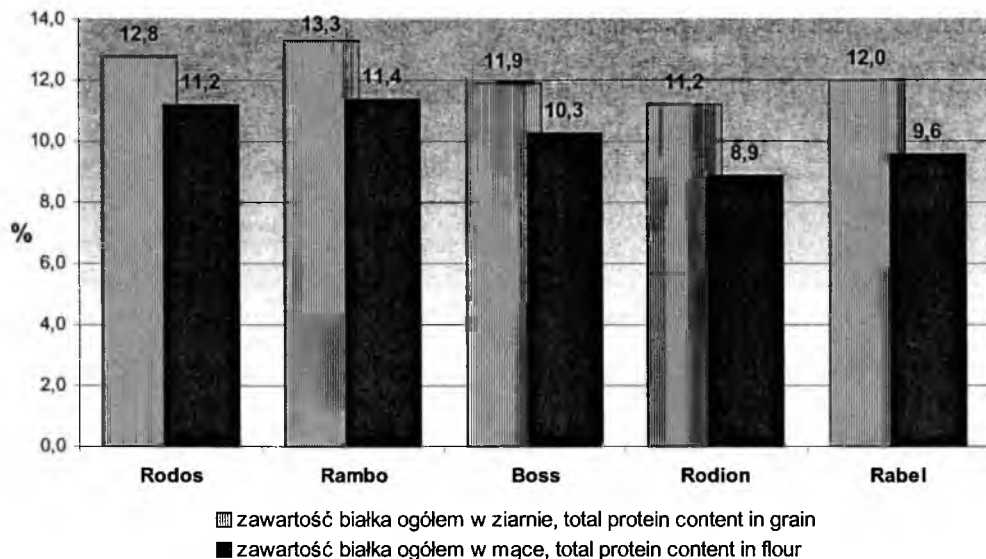
Cechy jakościowe ziarna różnych odmian jęczmienia jarego ze zbioru w 1997 roku.
Qualitative traits of grains of different spring barley varieties from the 1997 harvest.

Odmiany Varieties	Cecha / Trait			
	Wyrównanie ziarna Equalize of grain %	Wydajność mąki Flour extraction %	Liczba opadania Falling number s	Zawartość skrobi Starch content %
Rodos	89,2	34,7	401	61,0
Rambo	94,3	33,0	435	59,9
Boss	94,1	37,3	460	60,5
Rodion	93,5	36,7	435	61,0
Rabel	92,0	32,7	433	61,6
\bar{X}	92,6	34,9	433	60,8

Ziarno badanych odmian jęczmienia charakteryzowało się niską aktywnością amylolityczną mierzoną liczbą opadania (tab. 1). Podobne wyniki uzyskali Bhattya [5] oraz Subda i wsp. [17, 18]. W obecnych badaniach wartości liczby opadania wahały się od 401 do 460 s (Tab. 1).

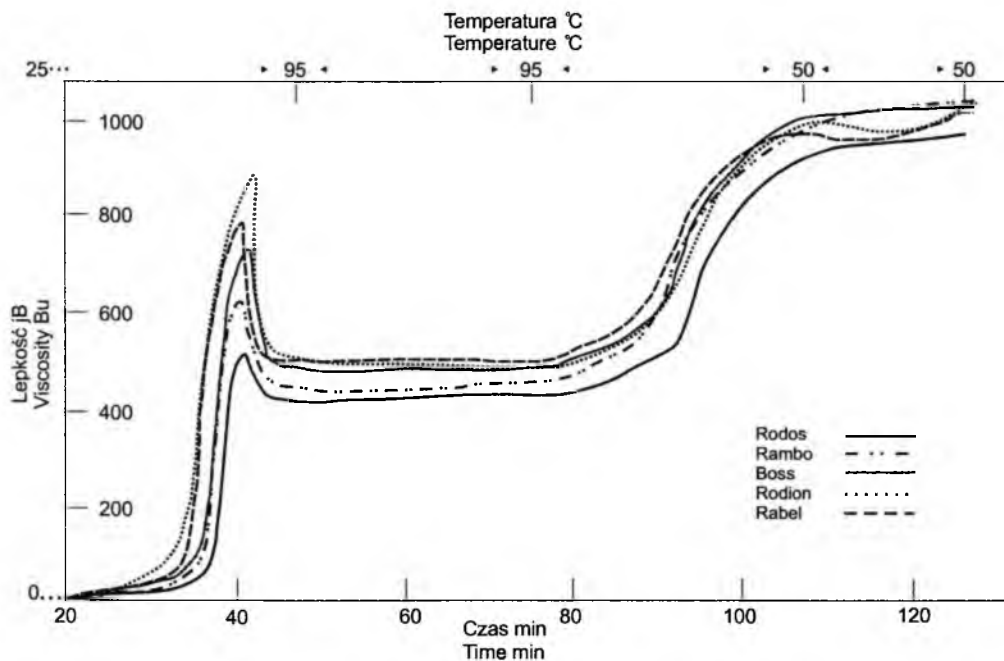
Na podstawie zestawionych danych można również stwierdzić małe zróżnicowanie jęczmienia pod względem zawartości skrobi, od 59,9 do 61,6% (tab. 1). Potwierdziło to wyniki uzyskane przez innych autorów [17, 18]. Mniejszą zawartość skrobi oznaczyli Björck i wsp. [7], większą natomiast Ingledow i wsp. [13] oraz Knuckles i wsp. [14].

Badane odmiany zawierały od 11,2 do 13,3% białka ogółem w ziarnie i od 8,9 do 11,4% w mące (rys. 1). Najwięcej białka w ziarnie i w mące zawierała odmiana Rambo, najmniej natomiast odmiana Rodion. Wyniki uzyskane w omawianej obecnie pracy (rys. 1) i innych autorów [9, 16] wskazują na dużą zmienność tej cechy.



Rys. 1. Zawartość białka ogółem w ziarnie i mące badanych odmian jęczmienia jarego.

Fig. 1. Total protein content in grain and flour of examined spring barley varieties.



Rys. 2. Amylogramy kleików mącznych jęczmienia jarego.

Fig. 2. Amylograms of flour pastes of spring barley.

Tabela 2

Charakterystyka amylograficzna mąki z badanych odmian jęczmienia jarego.
Amylographic characteristic of flour of examined spring barley varieties.

Odmiany Varieties	Cecha / Trait						
	Temperatura początkowa kleikowania Initial temperature of gelatinization °C	Temperatura końcowa kleikowania Final temperature of gelatinization °C	Czas kleikowania Gelatinization time min	Maksymalna lepkość kleiku mącznego Peak viscosity of flour pastes jB	Lepkość po trzymania przez 30 minut w temperaturze 95°C Viscosity at end of hold by 30 minute in 95°C jB	Lepkość po ochłodzeniu do temperatury 50°C Viscosity after cooling to 50°C jB	Lepkość po przetrzymaniu przez 20 minut w temperaturze 50°C Viscosity at end of hold by 20 minute in 50°C jB
Rodos	56,5	92,5	45,0	510	430	900	970
Rambo	56,5	91,5	44,5	620	460	980	1040
Boss	58,0	92,0	44,5	720	480	1010	1030
Rodion	56,5	91,5	44,5	890	480	1000	1030
Rabel	53,5	92,0	44,5	790	490	980	1030
\bar{X}	56,2	91,9	44,6	706	468	974	1020

W przeprowadzonych obecnie badaniach oraz wcześniejszych Bhattý'ego [5] oraz Subdy i wsp. [17, 18] wykazano, że mąka z ziarna różnych odmian jęczmienia charakteryzuje się wysoką początkową (od 53,5 do 58,0°C) i końcową (od 91,5 do 92,5°C) temperaturą oraz czasem kleikowania (44,5 do 45,0 min) (tab. 2). W badaniach własnych stwierdzono, że oceniane odmiany mało różniły się końcową temperaturą i czasem kleikowania mąki. Wysoką początkową temperaturą kleikowania odznaczał się kleik z mąki Boss (58,0°C), a najniższą kleik z mąki odmiany Rabel (53,5°C).

Spośród badanych cech amylograficznych największą zmiennością charakteryzowała się maksymalna lepkość kleików mącznych (510 do 890 jB) (Tabela 2). Podobne wyniki uzyskała Subda i wsp. [18]. Bhattý [5] uważa, że mąka jęczmienna charakteryzuje się wyższą maksymalną lepkością kleiku niż mąka pszenna.

Wykazano małą zmienność lepkości po 30 minutowym przetrzymaniu w temperaturze 95°C (430 do 490 jB) (tab. 2). Okazało się, że lepkość po przetrzymaniu zmniejszała się o 80 do 410 jB (rys. 2, tab. 2). Bhattý [5] twierdzi, że zmniejszenie lepkości po przetrzymaniu wskazuje na małą trwałość ziarn skrobi.

Lepkość kleików mącznych po ochłodzeniu wahała się od 900 do 1010 jB (Tabela 2). Ponadto stwierdzono, że lepkość po ochłodzeniu do 50°C zwiększyła się średnio o 506 jB w porównaniu do lepkości po przetrzymaniu w 95°C. Potwierdza to wyniki uzyskane przez Bhattý'ego [5] oraz Subdę i wsp. [18]. Bhattý [5] podaje, że zwiększenie lepkości po ochłodzeniu informuje, że ziarna skrobi łatwo ulegają rozpadowi w gorącym kleiku, a w czasie chłodzenia amyloza łatwo retrograduje. Wykazano, że

Tabela 3

Cechy reologiczne ciasta z mąki jęczmiennej, oznaczone w farinografie Brabendera.
Rheological traits of dough from barley flour, examined in Brabender farinograph.

Odmiany Varieties	Cecha / Trait						
	Wodochłonność mąki Flour water absorption %	Rozwój ciasta Dough development time min	Stołość ciasta Stability of dough min	Czas do maksymalnej wysokości Peak time min	Rozmięczenie ciasta Softening of dough jB	Czas do załamania Time to breakdown min	Wartość walorymetryczna Valorimetric value ju
Rodos	73,0	1,1	9,0	1,4	30	12,2	53
Rambo	71,2	1,2	0,8	1,4	60	3,3	45
Boss	72,4	1,0	0,9	1,3	80	2,4	39
Rodion	75,2	0,8	0,7	1,2	100	1,6	49
Rabel	72,5	1,4	10,1	2,0	20	14,3	54
\bar{X}	72,9	1,1	4,3	1,5	60	6,8	48

przetrzymanie kleików mącznych przez 20 minut w temperaturze 50°C spowodowało nieduże zwiększenie lepkości. Dengate [8] uważa, że na lepkość kleików mają wpływ ilość uszkodzonej skrobi, wielkość ziarenek oraz skład skrobi.

Mąka jęczmienna charakteryzuje się dużą zdolnością wiązania wody [5, 18], wyższą niż mąka pszenna [6]. Podobne wartości wodochłonności uzyskano w niniejszej pracy (tab. 3). Wodochłonność mąki jęczmiennej mieściła się w zakresie od 71,2 do 75,2% w zależności od odmiany. Stwierdzono, że ciasto z mąki jęczmiennej miało krótki czas rozwoju (1,2 do 2,0 min). Bhatti [5] podaje, że krótki czas rozwoju wskazuje na dużą szybkość wiązania wody przez mąkę jęczmienną. Zaobserwowano duże zróżnicowanie czasu stałości ciasta, czasu do załamania, rozmiękczenia ciasta i wartości walorymetrycznej. Ciasto z mąki odmian Rodos i Rabel odznaczało się długim czasem stałości i czasem do załamania, małym rozmiękczeniem i dużą wartością walorymetryczną, co predysponuje mąkę z tych odmian do wykorzystania w piekarstwie w mieszankach z mąkami pszennymi.

Wnioski

1. Stwierdzono, że ziarno wszystkich badanych odmian jęczmienia charakteryzuje się wysokim wyrównaniem, niską aktywnością α -amylazy i dużą zawartością skrobi. Wykazano zróżnicowanie odmian jęczmienia pod względem wymienionych cech, zawartości białka ogółem wydajności mąki.
2. Mąka jęczmienna charakteryzowała się wysoką początkową i końcową temperaturą kleikowania oraz czasem kleikowania. Temperatura końcowa i czas kleikowania były mało zróżnicowane.
3. Wykazano znaczną zmienność maksymalnej lepkości, lepkości po przetrzymaniu w temperaturze 95°C przez 30 minut, po ochłodzeniu do 50°C oraz po przetrzymaniu w tej temperaturze przez 20 minut.
4. Mąka jęczmienna charakteryzowała się dużą zdolnością wiązania wody.
5. Ciasto jęczmienne z mąki odmian Rodos i Rabel odznaczało się dobrymi właściwościami reologicznymi, co predysponuje mąkę z tych odmian do wykorzystania w piekarstwie w mieszankach z mąkami pszennymi.

LITERATURA

- [1] AACC. The farinograph handbook. St. Paul. M.N. 1972.
- [2] Bhatti R.S.: Physicochemical and functional (breadmaking) properties of hull-less barley fractions. *Cereal Chem.*, **63**, 1986, 31.
- [3] Bhatti R.S.: Milling yield and flour quality of hull-less barley. *Cereal Food World.*, **32**, 1987, 268.

- [4] Bhatti R.S.: β -glucan content and viscosities of barleys and their roller-milled flour and bran products. *Cereal Chem.*, **69**, 1992, 469.
- [5] Bhatti R.S.: Physicochemical properties of roller-milled barley bran and flour. *Cereal Chem.*, **70**, 1993, 397.
- [6] Bhatti R.S.: Milling of regular and waxy starch hull-less barleys for the production of bran and flour. *Cereal Chem.*, **74**, 1997, 693.
- [7] Björck J., Eliasson A.C., Drews A., Gudmundsson M., Karlson R.: Some nutritional properties of starch and dietary fiber in barley. Genotypes containing different levels of amylose. *Cereal Chem.*, **67**, 1990, 327.
- [8] Dengate H.N.: Swelling, pasting and gelling of wheat starch. Pages 49-82 in *Advances in Cereal Science and Technology*, vol. VI. J. Pomeranz, ed Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul. M.N. 1984.
- [9] El-Negoumy A.M., Newman C.W., Moss B.R.: Amino acid composition of total protein and electrophoretic behaviour of protein fractions of barley. *Cereal Chem.*, **56**, 1979, 468.
- [10] Fadel J.G., Newman R.K., Newman C.W., Barnes A.E.: Hypocholesterolemic effects of beta-glucans in different barley diets fed to broiler chicks. *Nutr. Rep. Int.*, **35**, 1987, 1049.
- [11] Gąsiorowski H.: Aspekty żywieniowe jęczmienia i jego przetworów, w: Gąsiorowski H. (red.), *Jęczmień - chemia i technologia*, PWRiL, Poznań 1997, s. 164.
- [12] Ingledow W.M., Jones A.M., Bhatti R.S., Rossnagel B.G.: Fuel alcohol production from hull-less barley. *Cereal Chem.*, **72**, 1995, 147.
- [13] Kawka A., Abdalla M., Gąsiorowski H.: Jęczmień jako surowiec do produkcji chleba plackowego. *Przegl. Piek. i Cuk.*, **3**, 1993, 17.
- [14] Knuckles B.E., Chiu M.M., Betschart A.A.: β -glucan enriched fractions from laboratory-scale dry milling and sieving of barley and oats. *Cereal Chem.*, **69**, 1992, 198.
- [15] Lue S., Hsieh F., Huff H.F.: Estimation cooking of corn meal and sugar beef fiber: effects on expansion properties, starch gelatinization and dietary fiber content. *Cereal Chem.*, **68**, 1991, 227.
- [16] Newman C.W., Newman R.K.: Nutritional aspects barley as food grain. *International Symposium. September 7-10. 1992. Upssala, Sweden. Pages 134.*
- [17] Subda H., Gniłka P., Czubaszek A.: Charakterystyka jakości ziarna i mąki jęczmienia jarego i oziwego. *Materiały XXVII Sesji Naukowej KTiChŻ PAN, Szczecin 1996*, s. 24.
- [18] Subda H., Gniłka P., Czubaszek A., Karolini-Skaradzinska Z.: Skład chemiczny i wartość technologiczna mąki odmian jęczmienia jarego i oziwego. *Biul. Inst. Hod. i Aklim. Rośl.*, **203**, 1997, 147.
- [19] Vasanthan T., Bhatti R.S.: Starch purification after pin milling and air classification of waxy, normal and high amylose barleys. *Cereal Chem.*, **72**, 1995, 379.
- [20] Wood P.J., Braaten J.T., Scott F.W., Riedel D., Poste L.M.: Comparison of viscous properties of oat and guar gum and the effects of these and oat bran on glycaemic index. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1990, 753.
- [21] Zbiór PN i BN. Ziarno zbóż, roślin strączkowych i roślin oleistych. *Wyd. Normal. Warszawa 1974.*

CHARACTERIZATION OF STARCH QUALITY AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF DOUGH OF SPRING BARLEY VARIETIES

S u m m a r y

Grain of five spring barley varieties: Rodos, Rabmo, Boss, Rodion, Rabel from the 1997 harvest was investigated. It was concluded, that barley varieties differed in equalize of grain and total protein content. Investigated varieties characterized by low alpha-amylase activity, measured by falling number. Grain of different barley varieties little differed in starch content. Barley flour distinguished by high initial and final temperature and long gelatinization time. During holding in constant temperature starch granules disintegrate, and amylose easily retrograde after cooling. Investigated barley flouris characterized by large water absorption. Barley dough is distinguished by its low rheological properties. ☒

RAFAŁ WOŁOSIAK, ELWIRA WOROBIEJ

AKTYWNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNA IZOLATU I HYDROLIZATÓW BIAŁEK GROCHU

Streszczenie

W pracy badano przeciwutleniające właściwości izolatu i hydrolizatów białek grochu. Stwierdzono, że białka te posiadają właściwość hamowania reakcji utleniania kwasu linolowego, która rośnie w wyniku hydrolizy enzymatycznej. W obrazach elektroforetycznych obserwowano wyraźne różnice w składzie frakcji hydrolizatów. Nie stwierdzono natomiast jednoznacznego wpływu powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej na aktywność antyoksydacyjną.

Wstęp

Utlenianie nienasyconych kwasów powoduje pogorszenie jakości żywności. Zapobiec temu można przez zastosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy: BHT i BHA. Użycie ich jest ograniczone ze względu na toksyczność [8]. Uwaga wielu ośrodków naukowych zwrócona jest na wprowadzenie naturalnych związków obecnych w roślinach, jako antyoksydantów [12, 13, 14, 16]. Wśród tych związków wykazano również antyoksydacyjne właściwości białek. Pomimo, że doniesienia z tego zakresu znane już były w latach siedemdziesiątych [10], to dopiero początek lat dziewięćdziesiątych przyniósł więcej publikacji opisujących właściwości przeciwutleniające białek [1, 2, 3, 4, 15]. Oprócz białek badano również preparaty otrzymane w wyniku ich hydrolizy proteinazami [3, 10]. Doniesienia o właściwościach antyoksydacyjnych białek podawane w literaturze dotyczą głównie roślin nie uprawianych na dużą skalę w naszym kraju. Dlatego w pracy podjęto badania nad preparatami białkowymi z nasion grochu.

Materiał i metody

Materiałem wyjściowym do doświadczeń była mąka otrzymana z obłuszczonego nasion grochu odmiany Poa. Nasiona pochodziły ze stacji hodowlanej IHAR w Radzi-

kwie. Do badań stosowano izolat białek grochu uzyskany przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,3) z alkalicznych ekstraktów mąki (pH 9,2). Z otrzymanych izolatów przygotowywano hydrolizaty. Białka izolatów hydrolizowano pepsyną (890 j./mg białka, Sigma P-7000) oraz proteinazą N (7,3 j./mg, Fluka 82458). W celu ustalenia optymalnych warunków hydrolizy przeprowadzono wstępne badania, w których stosowano różne czasy, a proces śledzono ilością uwolnionego azotu alfa-aminowego [6].

Izolaty hydrolizowano pepsyną przez 1 i 6 godzin, w dalszej części pracy oznaczono je symbolami, odpowiednio, PHP-1 i PHP-6. Natomiast hydrolizę proteinazą N prowadzono 0,5, 1 i 5 godzin i oznakowano symbolami, odpowiednio, PHN-0,5, PHN-1 i PHN-5.

W otrzymanych preparatach białkowych oznaczano azot, powierzchnię hydrofobowość aromatyczną z kwasem 8-anilino-1-naftaleno-sulfonowym [9, 7] oraz prowadzono elektroforetyczne rozdziały białek na 12,5% żelach poliakrylamidowych z SDS [11].

Właściwości antyoksydacyjne izolatu i hydrolizatów białka grochu oznaczano wobec kwasu linolowego (Sigma L-1268). Reakcję utleniania kwasu linolowego prowadzono w 60°C, w termostacie (Mettler), przez okres 29 dni. Do termostatowanych próbek kwasu linolowego dodawano preparaty białkowe w ilości 220 ppm. Próbką odniesienia był kwas linolowy bez dodatku preparatów. We wstępnych doświadczeniach ustalono dawki preparatów znoszących powstawanie nadtlenków. Proces utleniania śledzono metodą z tiocyanianem żelaza [1]. Pomiarów dokonywano na spektrofotometrze Novaspec II firmy Pharmacia LKB przy 500 nm.

Z otrzymanych wyników obliczano względną aktywność antyoksydacyjną wg wzoru:

$$A_a [\%] = \frac{A_w - A_p}{A_w} \times 100,$$

gdzie A_w - absorbanca próbki odniesienia

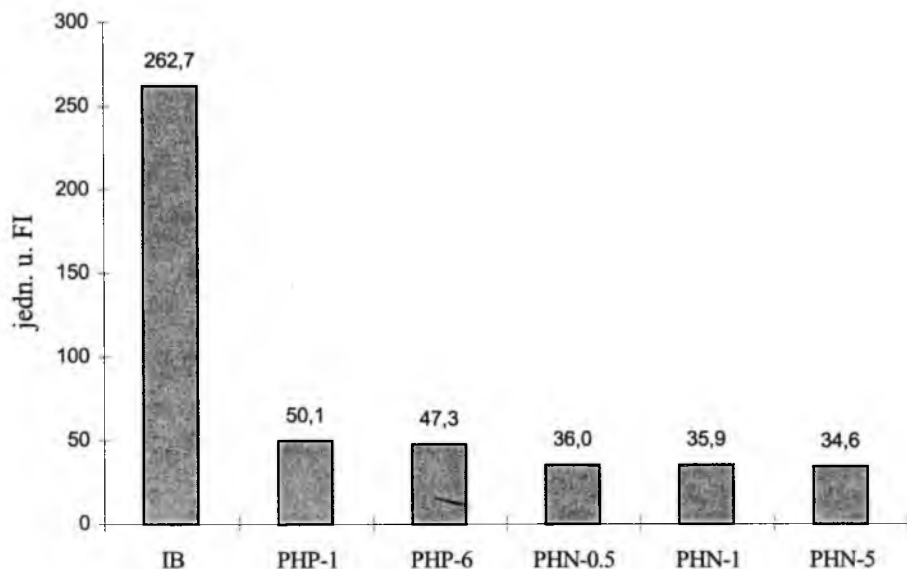
A_p - absorbanca próbki z preparatem białkowym.

Wyniki i ich omówienie

Przed przystąpieniem do określenia antyoksydacyjnych właściwości izolatu i hydrolizatów białkowych otrzymanych z grochu dokonano ich charakterystyki. Oznaczono zawartość białka, hydrofobowość aromatyczną i poddano rozdziałom elektroforetycznym.

Na podstawie badań wykazano, że zawartość białka w izolacie wynosiła 90,1%, w hydrolizatach była niższa i mieściła się w granicach 62-63% dla PHP i 72-73% dla PHN, tak więc czas hydrolizy nie wpływał na tę zależność, a jedynie zastosowany enzym.

Uwagę zwraca różnica pomiędzy powierzchniową hydrofobowością aromatyczną izolatu i hydrolizatów (rys. 1). Hydroliza przy użyciu pepsyny powodowała ponad pięciokrotne obniżenie wartości notowanych w izolacie, a hydroliza proteinazą N około 7,5 krotne. Wyniki te świadczą, że w izolacie jest większa ekspozycja aminokwasów aromatycznych na powierzchni białek niż w hydrolizatach.



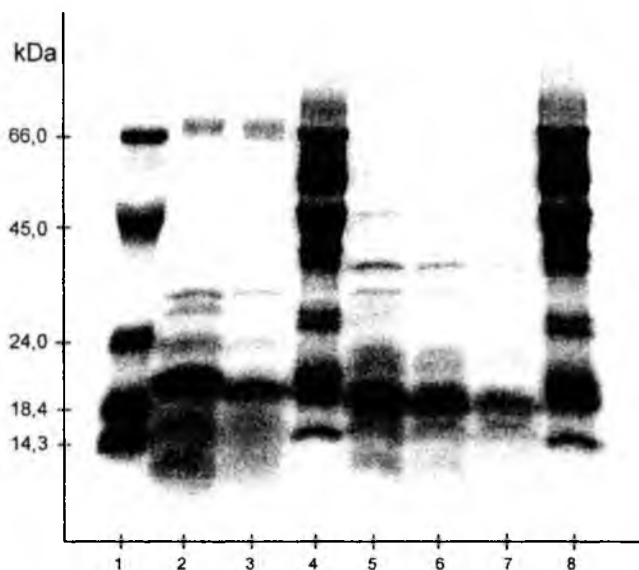
Rys. 1. Powierzchniowa hydrofobowość aromatyczna izolatu i hydrolizatów białka grochu.

Fig. 1. Surface aromatic hydrophobicity of pea protein isolate and hydrolysates.

W rozdzielach elektroforetycznych (rys. 2) widoczna jest wyraźna różnica pomiędzy hydrolizatami uzyskanymi z trawienia pepsyną i proteinazą N. Pepsyna w większym stopniu spowodowała hydrolizę frakcji białkowych izolatu o ciężarach cząsteczkowych powyżej 40 kDa w porównaniu z proteinazą N, pozostawiając jedynie ślady podjednostki o ciężarze 66 kDa.

Utlenianie kwasu linolowego z dodatkiem preparatów jako antyoksydantów oraz bez ich dodatku przedstawiono na rys. 3. i 4. Proces utleniania kwasu ma charakter krzywej Gaussa. Maksimum propagacji tworzenia nadtlenu przypadło pomiędzy 4 a 10 dniem doświadczenia. Widać wyraźne zahamowanie procesu utleniania kwasu linolowego przez preparaty białka grochu. Izolat białkowy wykazał nieco niższe

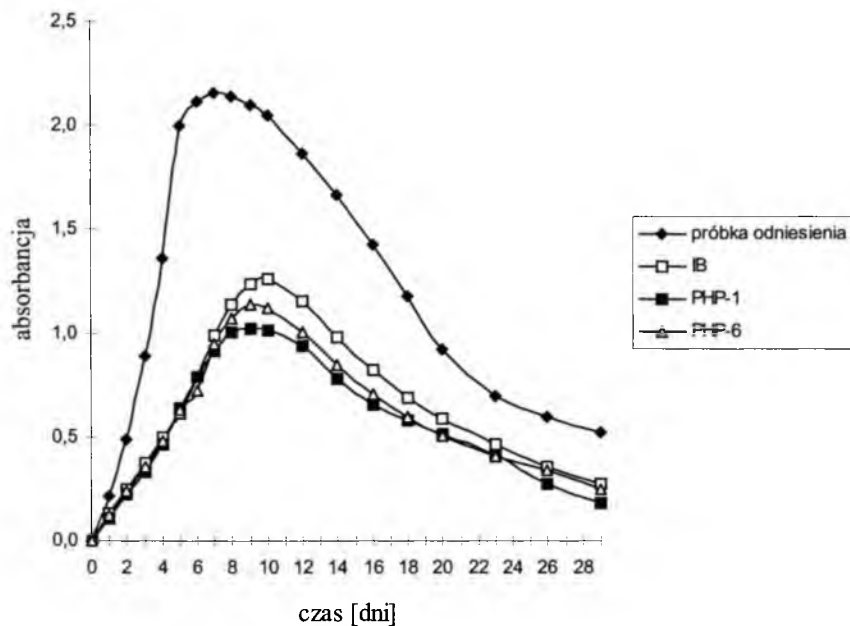
właściwości przeciwutleniające w porównaniu z hydrolizatami. Obliczona z otrzymanych pomiarów spektrofotometrycznych aktywność antyoksydacyjna najwyższe wartości osiągnęła w 5 dniu doświadczeń. Efektywniej działały PHN w porównaniu z PHP. Maksymalna wartość aktywności względnej dla PHN zawarta była w granicach 74-76%, a dla PHP wynosiła 68%. Zastosowane zróżnicowane czasy hydrolizy nie znalazły prawie żadnego odbicia we właściwościach antyoksydacyjnych preparatów. Obserwowane duże różnice w powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej pomiędzy izolatami białkowym, a hydrolizatami nie znalazły również odbicia we właściwościach antyoksydacyjnych. Wprawdzie Chen i wsp. [3] wykazali, że hydrolizaty białek soi miały większą aktywność niż izolaty, to jednak zależność ta nie była znacząca. W literaturze zwrócona jest uwaga również na to, że udział poszczególnych aminokwasów oraz ich sekwencja w peptydach ma znaczący wpływ na właściwości antyoksydacyjne [4]. Szczególną rolę przypisuje się histydynie i prolinie [4, 5].



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny preparatów białkowych na 12,5 % żelu poliakrylamidowym z SDS (1: marker, 2: PHP-1, 3: PHP-6, 4: IB, 5: PHN-0.5, 6: PHN-1, 7: PHN-5, 8: IB).

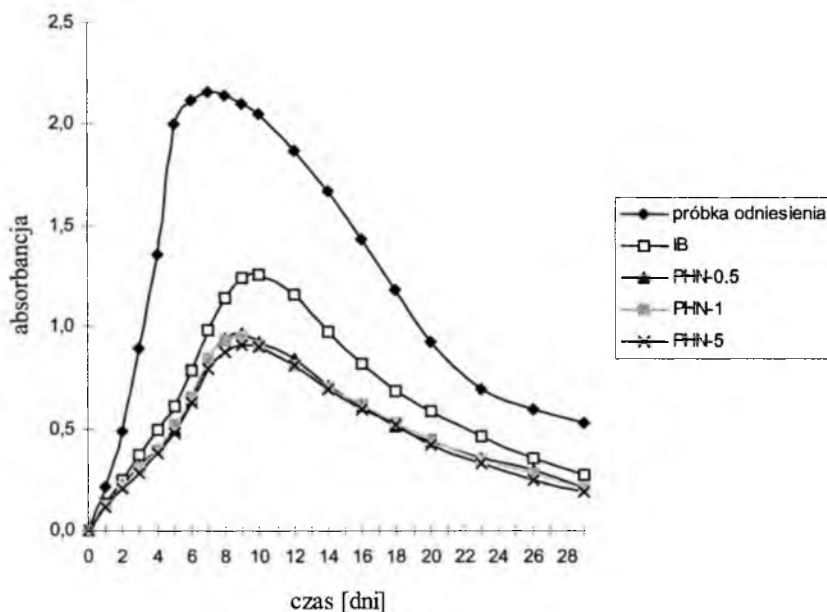
Fig. 2. 12.5% SDS – polyacrylamide gel electrophoresis of pea protein preparations (1: Dalton marker, 2: PHP-1, 3: PHP-6, 4: IB, 5: PHN-0.5, 6: PHN-1, 7: PHN-5, 8: IB).

Na podstawie rozdziałów elektroforetycznych można przypuszczać, że niskocząsteczkowe frakcje białkowe powstające w wyniku hydrolizy proteinazą N podjednostek o ciężarach cząsteczkowych 40-66 kDa mogą wpływać na lepsze właściwości antyoksydacyjne PHN w porównaniu z PHP.



Rys. 3. Wpływ dodatku izolatu i hydrolizatów pepsynowych na utlenianie kwasu linolowego.

Fig. 3. Effects of protein isolate and pepsin hydrolysates addition on linoleic acid oxidation.



Rys. 4. Wpływ dodatku izolatu i hydrolizatów N-proteazowych na utlenianie kwasu linolowego.

Fig. 4. Effects of protein isolate and proteinase N hydrolysates addition on linoleic acid oxidation.

Wnioski

1. Białka grochu obniżają tworzenie nadtlenków podczas utleniania kwasu linolowego.
2. Aktywność antyoksydacyjna białek wzrasta po hydrolizie enzymatycznej.

LITERATURA

- [1] Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F.J.: Addition of oxidized lipid/amino acid reaction products delays the peroxidation initiated in a soybean oil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2698-2701.
- [2] Carbonaro, M., Virgili, F., Carnovale, E.: Evidence for protein-tannin interaction in legumes: implications in the antioxidant properties of Faba bean tannins. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **29**, 1996, 743-750.
- [3] Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F.: Structural analysis of antioxydative peptides from soybean beta-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 574-578.
- [4] Chen, H-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K.: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1996, 2619-2623.
- [5] Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K.: Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 49-53.
- [6] Church, F.C. Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L.: Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1983, 1219-1227.
- [7] DiLollo, A., Alli, I., Biliaderis, C., Barthakur, N.: Thermal and surface active properties of citric acid-extracted and alkali-extracted proteins from *Phaseolus* beans. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 24-29.
- [8] Ford, S.M., Hook, J.B., Bond, J.T.: The effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on renal function in the rat. II. Effects on organic acid and base transport. *Fd Cosmet. Toxicol.*, **18**, 1980, 21-26.
- [9] Hayakawa, S., Nakai, S.: Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, **50**, 1985, 486-491.
- [10] Hayes, R.E., Bookwalter, G.N., Bagley, E.B.: Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review. *J. Food Sci.*, **42**, 1977, 1527-1532.
- [11] Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, **227**, 1970, 680-685.
- [12] Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 1988, 969-978.
- [13] Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P.: Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 4487-4490.
- [14] Wang, H., Cao, G., Prior, R.L.: Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1996, 701-705.
- [15] Wu, S.Y., Brewer, M.S.: Soy protein isolate antioxidant effect on lipid peroxidation of ground beef and microsomal lipids. *J. Food Sci.*, **59**, 1994, 702-706.
- [16] Yen, G.-C., Chen, H-Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 27-32.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEA PROTEIN ISOLATE AND HYDROLYSATES**S u m m a r y**

Antioxidant properties of pea protein isolate and hydrolysates have been investigated. Pea protein has an ability to decrease the number of hydroperoxides during oxidation of linoleic acid, which ability is increased after enzymatic hydrolysis. Differences in hydrolysates composition were observed on electroforetic patterns. No significant influence of aromatic hydrophobicity on antioxidative activity was confirmed. ✕

ADRIANNA MIKOŁAJCZAK, BEATA DRUŻYŃSKA

ANTYOKSYDACYJNE WŁAŚCIWOŚCI POLIFENOLI OKRYW NASIENNYCH FASOLI KOLOROWEJ

Streszczenie

W pracy podjęto tematykę związaną z przebadaniem właściwości antyoksydacyjnych związków polifenolowych, a głównie tanin, obecnych w okrywach nasion fasoli kolorowej. Izolację polifenoli przeprowadzono za pomocą ekstrakcji łuski 0,5% roztworem kwasu solnego w metanolu. Zebrany ekstrakt zagęszczano pod próżnią, a następnie liofilizowano.

W preparatach oznaczano m.in. zawartość tanin hydrolizujących i skondensowanych, katechin oraz antocyjanów.

Preparaty wykazywały właściwości przeciwutleniające. Preparat z fasoli brązowej, zawierający większą ilość tanin (92%), okazał się bardziej efektywnym antyoksydantem niż preparat z fasoli czerwonej.

Wstęp

W technologii żywności istnieje obecnie tendencja zastępowania syntetycznych przeciwutleniaczy naturalnymi inhibitorami utleniania, gdyż są one bardziej bezpieczne. Wśród występujących w surowcach roślinnych składników powszechnie znane są antyoksydacyjne właściwości polifenoli roślinnych (flawonoidów i fenolokwasów) [2, 4, 8, 14].

Aktywność przeciwutleniająca polifenoli czarnej herbaty, czerwonego wina czy nasion roślin oleistych była przedmiotem wielu prac [5, 6, 12, 16, 17]. Niewiele natomiast doniesień jest związanych z działaniem antyoksydacyjnym polifenoli zawartych w nasionach fasoli. Stąd w przedstawionej pracy podjęto tematykę związaną z przebadaniem związków polifenolowych, głównie tanin, obecnych w okrywach ich nasion.

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym były suche nasiona fasoli kolorowej. Badano dwie odmiany fasoli: o łusce czerwonej („Red Kidney”) i brązowej („Nida”).

Fasolę moczo w wodzie destylowanej 24 godziny, a następnie ręcznie obłuszczało. Uzyskaną łuskę suszono i rozdrabniano.

Polifenole z łuski ekstrahowano wg Tsudy [15]. Zebrane ekstrakty zagęszczano pod próżnią (40°C), a następnie liofilizowano. Otrzymane preparaty w dalszej części pracy opatrzone symbolami: liofilizowany preparat z łuski fasoli czerwonej - PBC, z łuski fasoli brązowej - PBB.

W badanych liofilizatach oznaczano: suchą substancję, popiół [9], żelazo [3], katechiny ogółem [13], taniny skondensowane [10], taniny hydrolizujące [1], antocyjany [13]. Właściwości antyoksydacyjne preparatów oznaczano metodą z tiocyjankiem żelaza [7, 15].

Przeciwutleniające właściwości liofilizatów badano z kwasem linolowym. Symulację jego utleniania prowadzono w temperaturze 60°C, umieszczając próbki w termostacie. Próbkę kwasu linolowego bez dodatku preparatów była traktowana jako próbka odniesienia. We wstępnych doświadczeniach ustalono dawkę preparatów, która wynosiła 0,5 ml 0,25% wodnego roztworu liofilizatu.

Stopień utlenienia kwasu oznaczano spektrofotometrycznie (500 nm) z tiocyjankiem żelaza. Pomiarów dokonywano co 24 godziny. Doświadczenia prowadzono przez 28 dni. Na podstawie uzyskanych wyników obliczano wartość względnej aktywności antyoksydacyjnej:

$$A_{kt} (\%) = A_{od} - A_{wł} / A_{od}$$

gdzie: A_{od} - absorbancja próbki odniesienia
 $A_{wł}$ - absorbancja próbki właściwej;

Wyniki i dyskusja

Skład chemiczny preparatów z łuski fasoli przedstawiono w tab. 1.

W preparatach oprócz suchej substancji i popiołu oznaczano również żelazo, gdyż jako metal o zmiennej wartościowości należy ono do czynników stymulujących procesy oksydacji. Nie stwierdzono obecności żelaza w preparatach.

Tabela 1

Skład chemiczny preparatów z łusek fasoli.
 Chemical compound of bean seed coat preparations.

Preparat Type of preparation	s.s. Dry mass %	Popiół Ash % s.s.	Żelazo Iron % s.s.	Fenole Phenols % s.s.
PBC	89,1	20,9	n.d.	35,7
PBB	91,1	20,1	n.d.	43,1

Tabela 2

Właściwości antyoksydacyjne preparatów otrzymanych z łuski fasoli.
Antioxidant properties of bean seed coat preparations.

Preparat Type of preparation	Katechiny Catechines (%)	Taniny skondensowane Condensed tanins (%)	Taniny hydrolizujące Hydrolysing tanines (%)	Antocyjany Anthocyanins (%)
	% ogólnej ilości / % of total amount			
PBC	3,1	21,5	44,4	31,0
PBB	4,9	44,5	47,1	3,5

W preparatach oznaczano zawartość katechin, antocyjanów, tanin skondensowanych i hydrolizujących. W tab. 2 podano % udział związków polifenolowych w stosunku do całkowitej zawartości polifenoli w preparatach.

Zawartość katechin ogółem, wyrażana jako epikatechina, wynosiła 1,10 mg/100 mg liofilizatu w PBC i prawie dwukrotnie więcej w PBB (2,12 mg/100 mg). Udział tego związku w stosunku do ogólnej zawartości polifenoli był najniższy.

Antocyjany wyraźnie przeważały w preparacie z łuski fasoli czerwonej (11,04 mg/100 mg), było ich prawie dziesięć razy więcej niż w preparacie z fasoli brązowej (1,49 mg/100 mg). Związane jest to z różnicą w zabarwieniu okryw nasiennych obu odmian fasoli. Barwniki antocyjanowe nadają barwę łusce, stąd większy ich udział w preparacie z fasoli o bardzo intensywnym czerwono-brunatnym zabarwieniu („Red Kidney”).

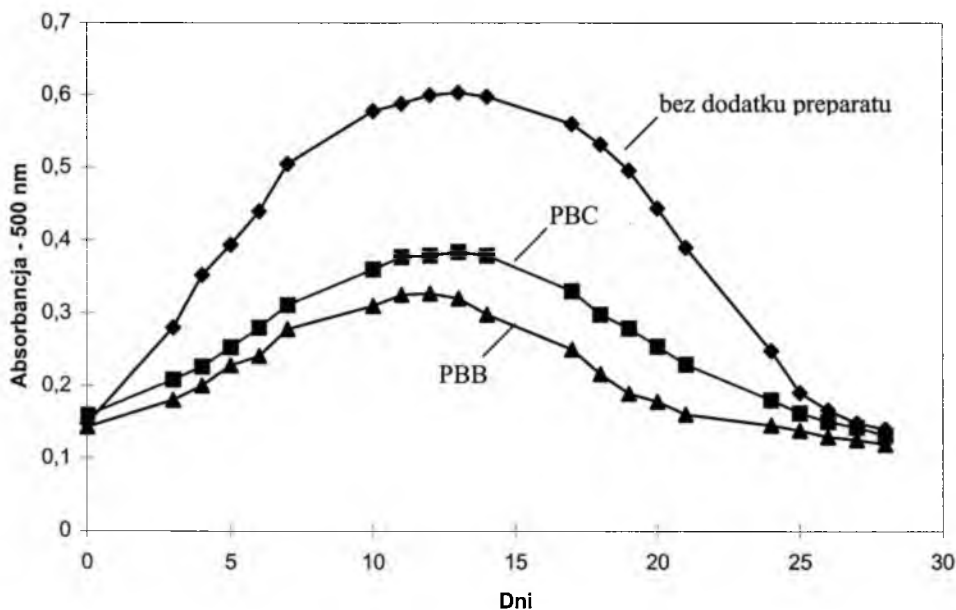
Taniny są to związki zróżnicowane pod względem struktury oraz właściwości. Dzielą się one na dwie grupy: taniny hydrolizujące i skondensowane. W niniejszej pracy oznaczano obie wyżej wymienione grupy. Zawartość tanin skondensowanych zgodnie z metodyką wyrażano w jednostkach katechiny, a tanin hydrolizujących w jednostkach kwasu taninowego. Zawartość tanin skondensowanych zależy w dużym stopniu od sposobu ekstrakcji (temperatury, czasu, rozpuszczalnika) oraz odmiany nasion [10, 11]. W badanych odmianach zawartość tanin skondensowanych wynosiła: 7,69 mg katechiny/100 mg liofilizatu PBC oraz 19,20 mg katechiny/100 mg liofilizatu PBB. Natomiast zawartość tanin hydrolizujących była na zbliżonym poziomie w obu preparatach i wynosiła 20,32 mg/100 mg w PBB i 15,88 mg/100 mg w PBC.

Badane preparaty różniły się więc wyraźnie zawartością poszczególnych polifenoli. W preparacie z fasoli czerwonej taniny hydrolizujące stanowiły ~ 44%, natomiast wysoka była zawartość antocyjanów ~ 31%. W łusce z fasoli brązowej przeważały taniny, ich ogólna zawartość wynosiła ~ 92%, a zawartość antocyjanów była na poziomie 3,5%.

Otrzymane preparaty polifenolowe z łuski fasoli czerwonej (PBC) i brązowej (PBB) stosowano jako antyoksydanty. Badano utlenianie kwasu linolowego, do którego dodano preparaty. Próbka kwasu linolowego bez dodatku preparatów była traktowana jako próbka odniesienia. Proces oksydacji prowadzono przez 28 dni, pobierając próbki do oznaczeń co 24 godziny. Wyniki przebiegu procesu oksydacji przedstawiono na rys. 1. Z danych wynika, że największe zmiany oksydacyjne kwasu linolowego zaszły po 14 dniach termostatowania. Barwniki otrzymane z łuski fasoli działały hamująco na proces utleniania kwasu. We wszystkich oznaczeniach otrzymano niższe wartości absorbancji w stosunku do próbki odniesienia. Preparat z fasoli brązowej działał bardziej efektywnie i w większym stopniu hamował utlenianie.

Obliczone wartości aktywności antyoksydacyjnej (tab. 3) wykazały, że preparat z fasoli brązowej ma lepsze właściwości antyoksydacyjne w porównaniu z preparatem otrzymanym z fasoli czerwonej.

W obu preparatach można było zaobserwować wzrost wartości w okresie między 7, a 10 dniem inkubacji. Następnie wartości te obniżały się i po 18–19 dniach ponownie rosły i znowu obniżały się. Obserwacje te mogą świadczyć o tym, że podczas termostatowania proces propagacji rodników nadtlenkowych przebiegał w kilku etapach.



Rys. 1. Proces utleniania kwasu linolowego.

Fig. 1. Linoleic acid oxidation process.

Tabela 3

Procentowy udział polifenoli preparatach.
Polyphenols contents in preparations.

Dni Days	Aktywność antyoksydacyjna / Antioxidative activity (%)	
	PBC	PBB
3	25,7	35,7
4	35,8	43,2
5	35,8	42,1
6	36,4	45,2
7	38,4	45,0
10	37,7	46,4
11	35,9	44,7
12	36,8	45,5
13	36,3	46,9
14	36,6	50,2
17	41,1	55,4
18	44,0	59,4
19	43,8	61,9
20	42,8	59,9
21	41,3	59,0
24	27,4	41,5
25	14,7	27,4
26	9,6	22,3
27	4,1	15,5
28	6,4	15,0

Preparat z fasoli brązowej działał skuteczniej prawdopodobnie w wyniku wyższej zawartości tanin. Preparat z fasoli czerwonej zawierał więcej antocyjanów, a mniej tanin. Działanie tego preparatu jako antyoksydanta było mniej skuteczne.

Wnioski

1. Otrzymane preparaty działały hamująco na proces utleniania kwasu linolowego.
2. Preparat z fasoli brązowej wykazywał wyższą aktywność antyoksydacyjną niż preparat z fasoli czerwonej.
3. Dominującą grupą polifenoli w łusce nasion fasoli kolorowej są taniny, ich ogólna zawartość w preparacie z fasoli czerwonej stanowi 66%, a w preparacie z fasoli brązowej 92%.


LITERATURA


- [1] Association of Official Analytical Chemist's (AOAC), 1990, nr 952.03.
- [2] Carbonaro i in.: Evidence for protein-tannin interaction in legumes: implications in the antioxidant properties of faba bean tannins. *Lebensm. Wiss. u.- Technol.*, **29**, 1996, 743.
- [3] Cygański A. *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*. WNT, Warszawa 1993.
- [4] Deshpande S. S., Cheryan M.: Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. of Food Sci.*, **2**, 1987, 332.
- [5] Husain S. R., Cillard J., Cillard P.: Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **26**, 1987, 2489.
- [6] Miyake T., Shibamoto T.: Antioxidative activities of natural compounds found in plants. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 1819.
- [7] Osawa T., Namiki M.: A novel type of antioxidant isolated from wear wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1981, 735.
- [8] Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze. *Przem. Spoż.*, **3**, 1995, 94.
- [9] PN – 90/A- 74101/02. Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych.
- [10] Price M. L., Van Scoyoc S., Butler L. G.: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, **5**, 1978, 1241.
- [11] Shahidi F., Naczki M.: Effect of processing on the content of condensed tannins in rapeseed meals. *J. of Food Sci.*, 1989, 4 1082.
- [12] Simonetti P., Pietta P., Testolin G.: Polyphenol content and antioxidant potential of selected italian wines. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 1152.
- [13] Swain T., Hillis W. E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 1959, 63.
- [14] Takeoka G.R. i in.: Characterization of Black Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3395.
- [15] Tsuda T., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T.: Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris L.* *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1994, 248.
- [16] Wiseman S.A., Balentine D. A., Frei B.: Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **37**, 1997, 705.
- [17] Yen G.-C., Chen H.-Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 27.

**ANTIOXIDANT PROPERTIES OF POLYPHENOLS EXTRACTED
FROM COLOURED BEAN SEED COATS**

S u m m a r y

Antioxidant properties of phenolic compounds, mainly tannins, present in red and brown bean seed coats were investigated. Polyphenols were extracted with 0.5% HCl in methanol, vacuum condensed and lyophilised.

The amount of hydrolysing and condensed tannins, catechines and anthocyanins was evaluated in preparations. Antioxidant properties were measured against linoleic acid. The process of oxidation was monitored with a spectrophotometric method. 

All the preparations exhibited antioxidant activity. The brown bean preparation, which had the high tannin content (92%), was more effective as an antioxidant than red bean preparation. 

STANISŁAW KALISZ

WYKORZYSTANIE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH Z TARCZYCY BAJKALSKIEJ (*SCUTELLARIA BAJKALENSIS*) W STABILIZACJI WIN ARONIOWYCH

Streszczenie

Naturalne barwniki antocyjanowe mogą być stosowane zamiennie z barwnikami syntetycznymi, jednak odznaczają się stosunkowo małą stabilnością. W moszczach i winach aroniowych antocyjany odgrywają istotną rolę w kształtowaniu ich jakości, w tym szczególnie barwy.

Zastosowanie metody chromatografii cieczowej pozwala na precyzyjne badanie ilościowego i jakościowego składu antocyjanów. Metoda ta umożliwia dokładną analizę przemian antocyjanów w produkcji moszczy i win oraz badanie efektów dodawania stabilizatorów barwy. W pracy badano możliwość stabilizacji czerwonej barwy moszczy i win aroniowych przez dodatek flawonów tarczycy bajkalskiej, zawierającej glikozydy skutelaryny i bajkaleiny.

Wstęp

Podstawowe wyróżniki jakościowe moszczy i win aroniowych wiążą się z zawartością w ich składzie barwników antocyjanowych. Zidentyfikowano cztery antocyjany: cyjanidyno-3-galaktozyd, cyjanidyno-3-glukozyd, cyjanidyno-3-arabinozyd i cyjanidyno-3-ksylozyd [3, 6, 7]. Pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych i biochemicznych ulegają one różnorodnym przemianom prowadzącym do utraty czerwonej barwy i brunatnieniu oraz zmianom przyczyniającym się do powstawania zmeńnień i osadów [5, 8, 9, 10, 11, 12, 13], co prowadzi do obniżenia aktywności biologicznej i jakości produktów.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa pozwala precyzyjnie określać ilościowy i jakościowy skład antocyjanów. Umożliwia też śledzenie przemian zachodzących podczas produkcji moszczy i win aroniowych. Metoda ta pozwala badać efekt dodatku stabilizatora na barwę.

Dodatek naturalnych stabilizatorów polifenolowych utrwała czerwoną barwę win oraz przeciwdziała niekorzystnym zmianom antocyjanów zachodzących pod wpływem enzymów, temperatury, dostępu tlenu i światła [5, 8, 9, 10, 12, 13]. Tworzenie kompleksów pomiędzy antocyjanami i innymi związkami fenolowymi zwiększają ich stabilność i intensywność barwy. Efekt stabilizacji polega na tworzeniu warstwowego kompleksu przez wiązanie wodorowe, co osłania cząsteczkę antocyjanu przed nukleofilową addycją i chroni przed utratą barwy [12].

W pracy podjęto próbę ustalenia najodpowiedniejszego momentu dodania stabilizatora w produkcji win aroniowych i określenia trwałości ich czerwonej barwy przez dodatek naturalnych stabilizatorów polifenolowych.

Materiały i metody badań

Przedmiotem badań były moszcze, nastawy, wytrawne wina aroniowe o zawartości alkoholu 10% objętościowych i kwasowości 5 g/dm³ po 42 dniowej fermentacji i 90 dniowym leżakowaniu w butelkach z jasnego i ciemnego szkła. Surowcem były owoce aronii czarnoowocowej (*Aronia melanocarpa*) pozyskane z plantacji prywatnej z Ząbkowic Śląskich. Owoce zostały zebrane w stanie pełnej dojrzałości, spełniały wymagania jakościowe normy BN-88/9136-14 [1].

W ramach prowadzonych doświadczeń wykonano sześć wariantów, różniących się sposobem przygotowania miazgi oraz momentem dodania stabilizatora. Zastosowaną substancją stabilizującą był preparat flawonów, ekstrahowany metanolem z korzenia tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria bajcalensis*) i wysuszony liofilizacyjnie, przygotowany w Katedrze Technologii Przetwórstwa Owoców i Warzyw Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Warianty doświadczeń stanowiły:

- próbki z owoców aronii nie rozparzanej: kontrolna (W1) bez dodatku stabilizatora i z dodatkiem stabilizatora przy rozmrażaniu (W5);
- próbki z owoców aronii rozparzanej: kontrolna (W2) bez dodatku stabilizatora, z dodatkiem stabilizatora do nastawu (W3), przy rozmrażaniu (W4) i do wina po fermentacji (W6).

Porcje owoców do przygotowywania poszczególnych nastawów rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 50°C przez 30 minut. W próbkach wariantu 4 i 5 podczas rozmrażania do owoców dodano po 0,75 g stabilizatora – preparatu tarczycy bajkalskiej zawierającej glikozydy skutelaryny i bajkaleiny, rozpuszczonego w 10 ml 0,1% węgla wapnia.

Owoce rozdrobniono homogenizatorem zanurzeniowym. Próbki surowca do wariantu 2, 3, 4, 6 rozparzono w łaźni wodnej utrzymując przez 5 minut temperaturę miazgi 80°C. Następnie próbki schłodzono zimną wodą do 65°C.

Przygotowaną miazgę tłoczono w laboratoryjnej prasie hydraulicznej "Zodiak" o nacisku tłoka do 5000 kg.

Z bilansu ekstraktu i kwasowości obliczono ilości cukru, moszczu i wody potrzebne do otrzymania nastawów.

Do każdego nastawu dodano po 0,38 g pożywki fosforanu amonu. Do wszystkich prób, oprócz wariantu 3 dodano po 0,19 cm³ kwaśnego siarczynu sodowego, celem ograniczenia rozwoju niepożądanego mikroflory. W przygotowaniu matki drożdżowej, rozcieńczono koncentrat jabłkowy do ekstraktu 20%, dodano fosforanu dwu amonowego i spasteryzowano. Po ochłodzeniu zaszczerpiono czystą kulturę drożdży rasy Madera. Namnażanie drożdży prowadzono w cieplarni w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Fermentację nastawów zaszczerpionych drożdżami rasy Madera przeprowadzono w kolbach szklanych w cieplarni w temperaturze 22°C.

Po 42 dniach fermentacji wino zlanano z osadu. Do wina nr 6 dodano 0,41 g stabilizatora. Wszystkie próbki podzielono na dwie części rozlewając je do butelek o pojemności 0,33 l z jasnego i ciemnego (brązowego) szkła. Butelki zakorkowano i pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 90 dni celem leżakowania.

Oznaczenie zawartości antocyjanów metodą chromatografii cieczowej

Oznaczenia prowadzono za pomocą chromatografu cieczowego firmy Waters, składającego się z detektora (Waters 486 Tunable Absorbance Detector) i systemu mieszania odczynników (Waters 600 E Multisolvent Delivery System). Chromatograf współpracował z komputerowym programem zbierania danych: Star Chromatography Workstation Firmy Varian. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChrospher[®] 100 RP-18, (5 μ, 4,6×220 mm), firmy Merck Labs z przedkolumną tej samej firmy.

Tabela 1

Gradient stosowany przy oznaczaniu antocyjanów.

Experimental conditions used in the determination of anthocyanins.

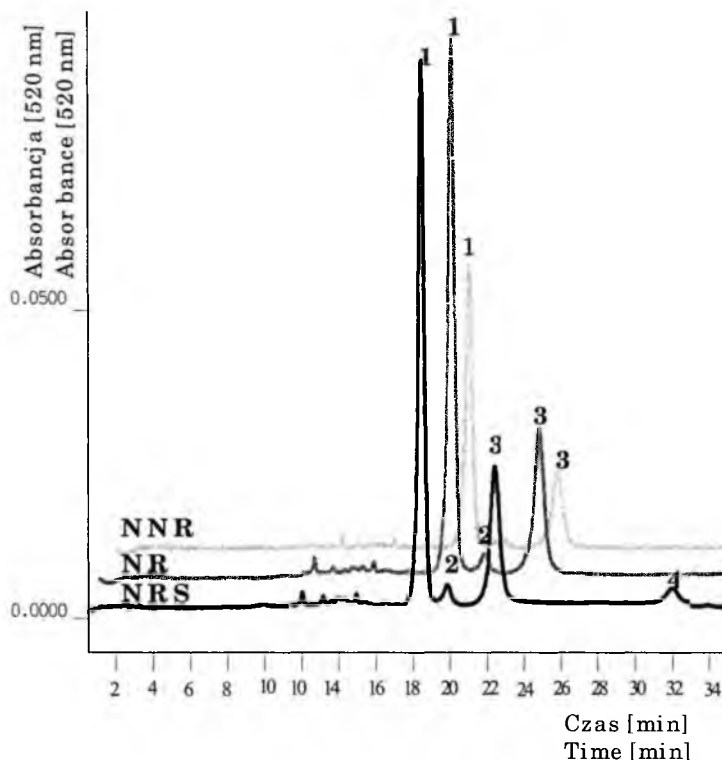
Czas / Time (min.)	Odczynnik A / Reagent A (%)	Odczynnik B / Reagent B (%)
0	0	100
7	15	85
22	15	85
30	20	80
35	25	75
40	35	65

Antocyjany oznaczano stosując 80% roztwór acetonitrylu w 4,5% kwasie mrówkowym (odczynnik A) i 4,5% kwas mrówkowy (odczynnik B), przy długości fali 520 nm i przepływie 1 cm³/min. Zastosowano gradient przedstawiony w tabeli 1.

Wyniki i dyskusja wyników

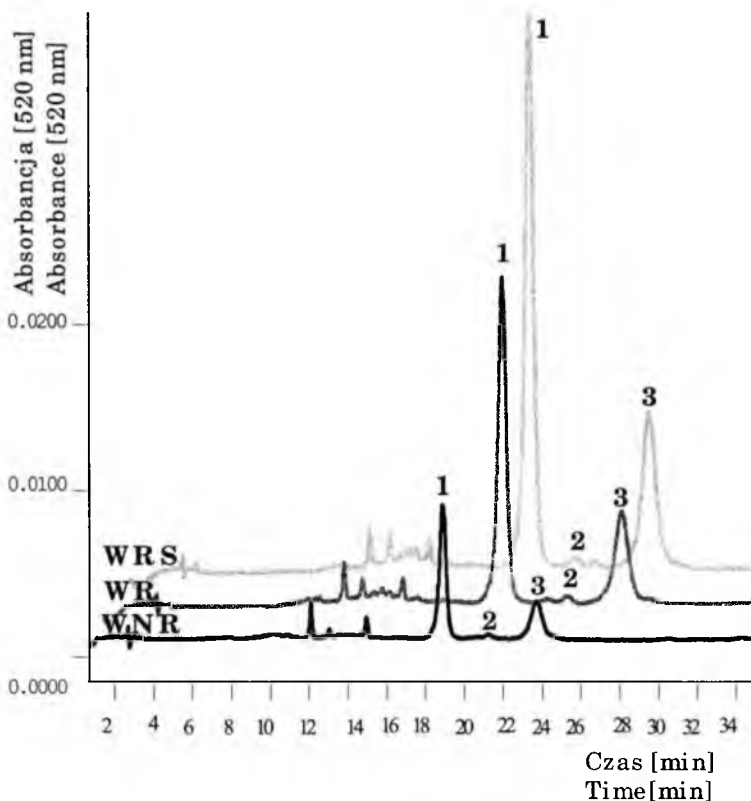
Tłoczenie miazgi po uprzedniej obróbce termicznej pozwoliło na lepszą ekstrakcję barwników antocyjanowych. Zawartość antocyjanów w próbkach rozparzanych, była o ponad 65% wyższa niż w próbkach tłoczonych na zimno.

Obróbka cieplna [10, 13] przez wyparcie powietrza zapobiega niekorzystnemu działaniu tlenu, jak również powoduje zniszczenie mikroflory powierzchniowej oraz unieczynnienie enzymów natywnych, minimalizując ich niekorzystny wpływ na stabilność soków i win.



Rys. 1. Chromatogramy (HPLC) antocyjanów w nastawie z aronii nie rozparzanej (NNR) oraz rozparzanej bez stabilizatora (NR) i z dodatkiem stabilizatora (NRS): 1 - Cyjanidyno-3-galaktozyd, 2 - Cyjanidyno-3-glukozyd, 3 - Cyjanidyno-3-arabinozyd, 4 - Cyjanidyno-3-ksylozyd.

Fig. 1. Chromatogram (HPLC) of anthocyanins in chokeberry must produced from no heated (NNR) and heated pulp without stabilizer (NR) and with addition of stabilizer (NRS): 1 - Cyanidin-3-galactoside, 2 - Cyanidin-3-glucoside, 3 - Cyanidin-3-arabinoside, 4 - Cyanidin-3-xyloside.

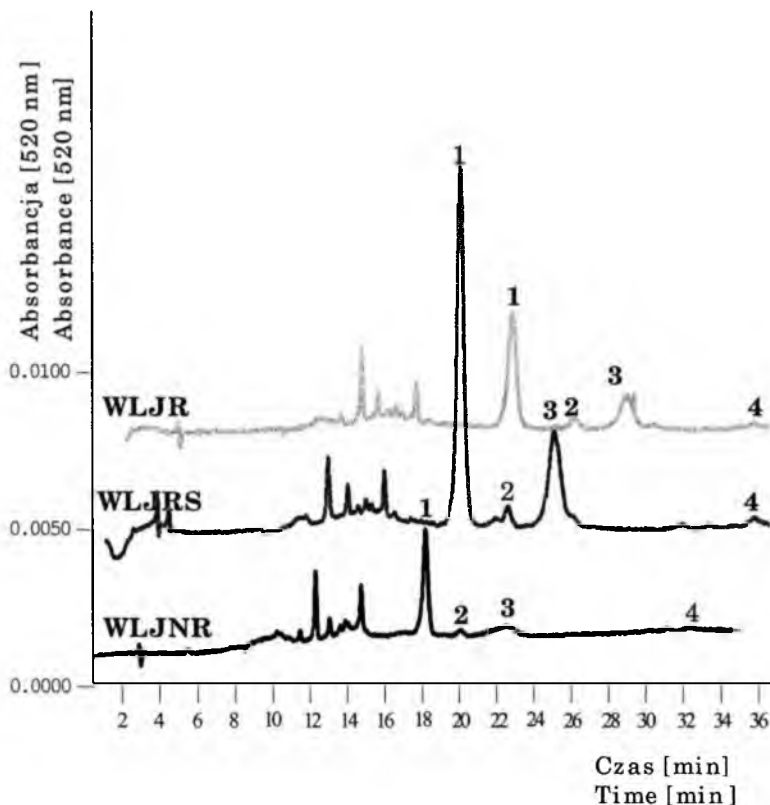


Rys. 2 Chromatogramy (HPLC) antocyjanów w młodym winie z aronii nie rozparzanej (WNR) oraz rozparzanej bez stabilizatora (WR) i z dodatkiem stabilizatora (WRS): 1 – Cyjanidyno-3-galaktozyd, 2 – Cyjanidyno-3-glukozyd, 3 – Cyjanidyno-3-arabinozyd, 4 – Cyjanidyno-3-ksylozyd.

Fig. 2. Chromatograma (HPLC) of anthocyanins in young wine from no heated (WNR) and heated chokeberry pulp without stabilizer (WR) and with addition of stabilizer (WRS): 1 – Cyanidin-3-galactoside, 2 – Cyanidin-3-glucoside, 3 – Cyanidin-3-arabinoside, 4 – Cyanidin-3-xyloside.

Badając ochronne działanie dodatku flawonów tarczycy bajkalskiej, zawierającej glikozydy skutelaryny i bajkaleiny, na barwniki antocyjanowe stwierdzono, że zabieg ten pozwala na lepsze zachowanie poziomu antocyjanów. Moment dodania substancji stabilizującej musi jedna nastąpić w możliwie najwcześniejszym stadium procesu przetworowego, zanim nie nastąpią jeszcze znaczne straty antocyjanów.

Wyniki badań z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC, zestawione na rysunkach 1–4, dowodzą, że proces rozparzania pozwala na lepsze wydobycie i zachowanie antocyjanów obecnych w surowcu, a tym samym ich wyższą zawartość w próbce końcowej.



Rys. 3 . Chromatogramy (HPLC) antocyjanów w winie z aronii nie rozparzanej (WLJNR) oraz rozparzanej bez stabilizatora (WLJR) i z dodatkiem stabilizatora (WLJRS) po leżakowaniu w butelce z jasnego szkła: 1 – Cyjanidyno-3-galaktozyd, 2 – Cyjanidyno-3-glukozyd, 3 – Cyjanidyno-3-arabinozyd, 4 – Cyjanidyno-3-ksylozyd.

Fig. 3. Chromatograms (HPLC) of anthocyanins in wine from no heated (WLJNR) and heated chokeberry pulps without stabilizer (WLJR) and with addition of stabilizer (WLJRS) after storage in bright {light} and amber glasses bottle: 1 – Cyanidin-3-galactoside, 2 – Cyanidin-3-glucoside, 3 – Cyanidin-3-arabinoaside, 4 – Cyanidin-3-xyloside.

Jak przedstawia chromatogram HPLC antocyjanów z nastawów (rys. 1) próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora zawiera 16,1% więcej antocyjanów niż próbka rozparzana bez stabilizatora oraz o 83,8% więcej niż próbka nierozparzana bez stabilizatora. Dodatek stabilizatora do miazgi w porównaniu do próbek rozparzanych i nierozparzanych bez stabilizatora podczas rozmrażania pozwolił na lepsze zachowanie zawartości wszystkich czterech antocyjanów odpowiednio: cyjanidyno-3-ksylozydu o 26,9 i 19,5%, cyjanidyno-3-glukozydu o 20,1 i 131,3%, cyjanidyno-3-arabinozydu o 18 i 79,2% oraz cyjanidyno-3-galaktozydu o 14,8 i 86,3 %.

Zasadność dodatku stabilizatora szczególnie do próbek rozparzanych potwierdza także chromatogram młodych win po fermentacji, przedstawiony na rys. 2. Antocyjany najlepiej zachowały się w próbce win leżakowanych, otrzymanych z aronii rozparzanej z dodatkiem stabilizatora. Prawdopodobnie wytworzenie kompleksu między cząsteczką antocyjanu, a flawonami tarczycy bajkalskiej chroni cząsteczkę antocyjanu przed nukleofilową addycją dzięki czemu ich zawartość w próbkach z dodatkiem preparatu flawonów tarczycy bajkalskiej jest większa niż w przypadku prób kontrolnych.

W próbce młodego wina z aronii rozparzanej z dodatkiem stabilizatora stwierdzono 2-krotnie więcej antocyjanów niż w próbce rozparzanej bez stabilizatora oraz 5 razy więcej w porównaniu do próbki nie rozparzanej bez stabilizatora. Ilość cyjanidyno-3-glukozydu w porównaniu do próbki kontrolnej rozparzanej i nierozparzanej zmalała odpowiednio 2- i 4-krotnie.

Największy spadek zawartości antocyjanów odnotowano w próbce kontrolnej nie rozparzanej. Zawartość cyjanidyno-3-glukozydu i cyjanidyno-3-arabinozydu zmalała tu ponad 10 i 26 razy, w porównaniu do nastawu.

Jak wynika z chromatogramu zamieszczonego na rys. 3, proces leżakowania powoduje dalszą degradację antocyjanów.

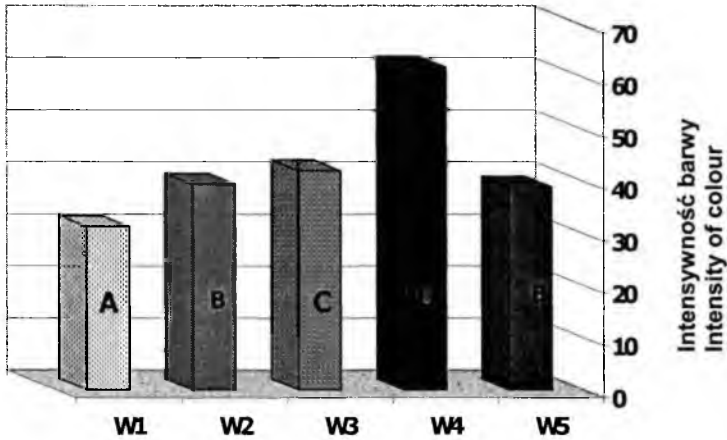
Najbardziej posunięte zmiany antocyjanów stwierdzono w próbce kontrolnej nierozparzanej. Cyjanidyno-3-ksylozyd i cyjanidyno-3-glukozyd występują tu w bardzo niewielkich ilościach. W stosunku do pozostałych antocyjanów stanowią one zaledwie 1,1 i 0,9%. Najlepiej zachował się cyjanidyno-3-galaktozyd, który stanowi 80,7% ogólnej zawartości antocyjanów.

W procesie leżakowania ogólna zawartość antocyjanów maleje 3,4-krotnie. Zawartość cyjanidyno-3-arabinozydu i cyjanidyno-3-galaktozydu maleje 3,5-krotnie natomiast cyjanidyno-3-glukozydu 1,6 krotnie.

Wyniki badań z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej, potwierdzają również zasadność stosowania rozparzania owoców w procesie technologicznym produkcji win aroniowych. Wykazano, że obróbka termiczna pozwala na lepsze wydobycie i zachowanie antocyjanów obecnych w surowcu, a tym samym ich wyższą zawartość w próbce końcowej. Próbki rozparzane, w porównaniu do analogicznych próbek nierozparzanych, zawierają 1,6–3,1 razy więcej antocyjanów, a ich straty podczas procesu fermentacji są 2-krotnie mniejsze.

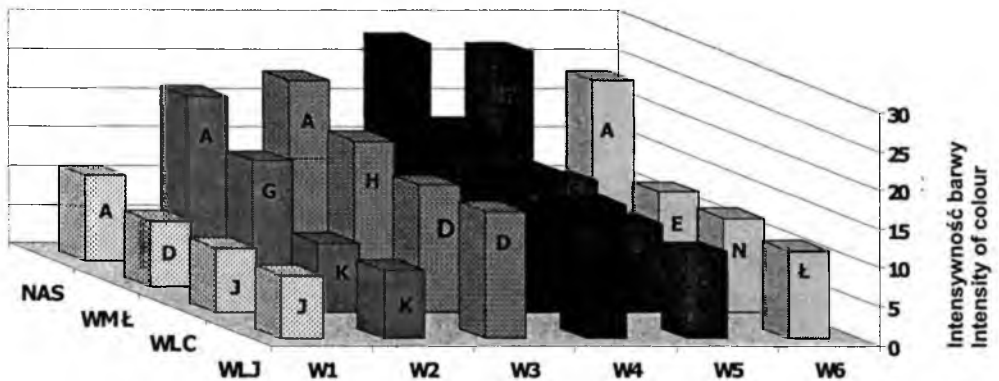
Największą intensywność czerwonej barwy moszczy wykazano w próbce kontrolnej rozparzanej z dodatkiem stabilizatora, a najmniejszą w próbce kontrolnej nie rozparzanej, (rys. 4). Fakt ten potwierdza celowość jak najwcześniejszego dodatku stabilizatora, co istotnie wpływa na intensywność barwy moszczy, szczególnie w przypadku próbek rozparzanych. Wykazano, że próbki otrzymane z aronii nierozparzanej wykazują mniejszą intensywność barwy co jest wynikiem gorszego odzysku barwnika z surowca, jak i postępującej jego degradacji pod wpływem enzymów.

Próbki rozparzane wykazują dużo intensywniejszą barwę niż próbki nierozparzane. Dodatek stabilizatora dodatkowo sprzyja zachowaniu czerwonej barwy, tak iż stonkowo dobrze zachowuje się również po leżakowaniu w butelce z jasnego szkła. Najbardziej niekorzystne zmiany barwy stwierdzono w przypadku próbek bez rozparzania i bez stabilizatora.



Rys 4. Wpływ momentu dodatku stabilizatora i sposobu przygotowania próbek na intensywność barwy moszczy aroniowych.

Fig. 4. The influence of the colour stabilizer addition time in the proces of production of chokeberry juices on the colour intensity of the product.



Rys. 5. Wpływ fermentacji i leżakowania win aroniowych na zmianę intensywności barwy w zależności od sposobu przygotowania próby i momentu dodania stabilizatora.

Fig. 5. Influence of fermentation and storage of chokeberry wines on change in intensity of colour on the time of the production process when the stabilizer was added.

Objaśnienia do rysunków 4–5:

W1 - próbka kontrolna nie rozparzana bez dodatku stabilizatora;

W2 - próbka kontrolna rozparzana bez dodatku stabilizatora;

W3 - próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora do nastawu;

W4 - próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora przy rozmrażaniu;

W5 - próbka nie rozparzana z dodatkiem stabilizatora przy rozmrażaniu;

W6 - próbka rozparzana z dodatkiem stabilizatora do wina po fermentacji;

A, B, C... próbki jednorodnie statystycznie - nie różniące się istotnie zawartością antocyjanów;

NAS - nastaw;

WML - wino młode po 42 dniach fermentacji;

WLC - wino po 90 dniowym leżakowaniu w butelce z ciemnego szkła;

WLJ - wino po 90 dniowym leżakowaniu w butelce z jasnego szkła.

Explanations to figures 4–5:

W1 - control sample - no heated, without addition of stabilizer;

W2 - control sample - heated, without addition of stabilizer;

W3 - heated sample with addition of stabilizer to must;

W4 - heated sample with addition of stabilizer to pulpe;

W5 - no heated sample with addition of stabilizer to pulp;

W6 - heated sample with addition of stabilizer to young wine;

A, B, C... statistically homogeneous samples are insignificantly differing in anthocyanins content

NAS - must;

WML - young wine after 42 days of fermentation;

WLC - wine after 90 days storage in dark glasses bottle;

WLJ - wine after 90 days storage in bright glasses bottle.

Największą intensywność zabarwienia stwierdzono w nastawie próbki wina z aronii rozparzanej z stabilizatorem dodanym do miazgi. W porównaniu do innych próbek intensywność zabarwienia była wyższa o 4,2–154,6% (rys. 5).

Wykazano również, iż w kolejnych etapach produkcji win aroniowych następuje spadek intensywności zabarwienia. W wyniku fermentacji intensywność zabarwienia maleje o 29,4–70,6%, a podczas leżakowania o kolejne 4,6–94,3%.

Badając wpływ barwy opakowania na zmianę intensywności zabarwienia podczas leżakowania win, istotne różnice wykazano jedynie w próbkach rozparzanych z stabilizatorem dodanym do miazgi i wina.

Spadek intensywności zabarwienia jest następstwem przemian zachodzących w winie. Według Gasika [4], na skutek zbyt daleko posuniętej polimeryzacji antocyjanów następuje ich wypadanie z roztworu i wyjaśnienie barwy.

Wnioski

1. Do produkcji czerwonych win aroniowych korzystnie jest stosować moszcze otrzymane z aronii rozparzanej.

2. Najlepszy efekt stabilizacji czerwonej barwy uzyskuje się dodając stabilizator bezpośrednio do miazgi, podczas rozparzania.
3. Proces fermentacji i leżakowania powoduje obniżenie zawartości antocyjanów 4,9–11,6-krotnie.
4. Leżakowanie win w butelkach z ciemnego szkła, w porównaniu do próbek leżakowanych w butelkach z jasnego szkła, powoduje mniejszą degradację antocyjanów.

LITERATURA

- [1] BN-88/9136-14 Owoce świeże. Aronia czarnoowocowa.
- [2] Ciołkowska-Paluch G.: W obronie aronii. Wiadomości Zielarskie, **10-11**, 1990, 27.
- [3] Czapski J., Bresińska A., Gorączka A., Limanówka-Jacygrad D.: Colour of Chokeberry nectars. Proceedings of the Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food Colourants and Antioxidants. 1996, s.64-69.
- [4] Gasik A.: Rola związków polifenolowych w tworzeniu cech sensorycznych żywności. Przem. Spoż., **7**, 1983, 352-356.
- [5] Horubała A.: Zmiany barwy soków owocowych w procesie technologicznym ich otrzymywania i przechowywania. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **8**, 1996, 31-34.
- [6] Oszmiański J., Sapis J.: Anthocyanins in Fruits of Aronia Melanocarpa (Chokeberry). Journal of Food Science, **53**, 4, 1988, 1241-1242.
- [7] Oszmiański J., Claude-Sapis J.: Pochodne kwasów hydroksycynamonowych w owocach aronii melanocarpa elliot. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu. Technologia Żywności V. **184**, 1989, 75-87.
- [8] Oszmiański J.: Próby stabilizacji barwników antocyjanowych owoców borówki kamczackiej (*Lonicera Kamtschatica*). Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Technologia Żywności, VIII, **273**, 1995, 73-82.
- [9] Oszmiański J.: Wpływ dodatku pigwowca na stabilność antocyjanów barwnika aroniowego. Przem. Spoż., **7**, 1992, 182-183.
- [10] Oszmiański J., Sożyński J.: Wpływ warunków otrzymywania oraz przechowywania soku z aronii na związki fenolowe i barwę. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu. Technologia Żywności V., **184**, 1984, 89-100.
- [11] Pizło A., Dobrzańska E.: Stabilność wybranych antocyjanów w wódkach, Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **6**, 1995, 14-16.
- [12] Sokół-Łętowska A., Oszmiański J., Sożyński J.: Wpływ dodatku aronii na stabilność związków fenolowych i barwę soku z czarnej porzeczki. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu. Technologia Żywności V., **184**, 1991, 89-99.
- [13] Zając B.K., Wilska-Jeszka J.: Antocyjany naturalne barwniki dla przemysłu spożywczego. Cz. II. Otrzymywanie barwników antocyjanowych z wyłtoków owoców czarnej porzeczki. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **2**, 1992, 20-23.

**UTILIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTED FROM SKULLCAP
(*SCUTELLARIA BAJKALENSIS*) IN CHOKEBERRY WINES STABILIZATION**

S u m m a r y

Natural anthocyanin colorants are alternative to artificial synthetic ones but they are characterized by relatively low stability. Anthocyanins contained in chokeberry juices and wines constitute the high quality and especially perfect colour of these products.

The application of the high-pressure liquid chromatography (HPLC) methods enables the precise determination of qualitative and quantitative composition of the anthocyanin content. The method makes possible the detailed analysis of the transformation of the anthocyanins content during the production process of chokeberry juices and wines and the effects of colour stabilizers addition on them. The possibility of red colour stabilization of chokeberry juice and wine by skullcap flavons *Scutellaria bajcalensis* addition was investigated. ❏

EWA MAJEWSKA

WYKORZYSTANIE KONDUKTOMETRII DO OKREŚLENIA ZAWARTOŚCI SKŁADNIKÓW MINERALNYCH W MIODZIE

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było stwierdzenie, czy istnieje współzależność między zawartością popiołu i przewodnością elektryczną właściwą miodów pszczelich. Materiał badawczy stanowiły miody pszczele różnego typu, jasne i ciemne produkowane w Polsce. Zawartość popiołu, w zależności od typu i odmiany, wynosiła od 0,04 do 0,67 g/100 g. Odpowiadająca jej przewodność elektryczna właściwa przyjmowała wartości od 0,9 do $10,7 \cdot 10^{-4}$ S/cm. Analiza statystyczna wyników wykazała istnienie ścisłej współzależności między zawartością popiołu i przewodnością elektryczną właściwą. Świadczą o tym wysokie współczynniki determinacji. Pomiar konduktometryczny jest pomiarem szybkim i jednocześnie prostym do wykonania, może więc być stosowany do oznaczania zawartości popiołu w miodach.

Wstęp

Mikroelementy są nieorganicznymi składnikami pokarmu, niezbędnymi do prawidłowego przebiegu procesów życiowych. Bez tych ważnych dla nas czynników niemożliwe jest utrzymanie zdrowia, a nawet życia. Składniki mineralne, ze względu na ich stosunkowo niewielką, w porównaniu do cukrowców, tłuszczów i białek, zawartość w żywności zalicza się do składników uzupełniających.

O jakości miodu naturalnego decyduje szereg różnych, zmiennych czynników. Wciąż jest aktualna opinia White'a [11] z 1957 r.: „Wydaje się, że badania miodu są jeszcze w takim stadium, w którym dalsze prace powodują raczej wzrost skomplikowania niż uproszczenie. Z pewnością należy jednak mieć nadzieję, że wkrótce rezultatem bieżących i przyszłych badań, dotyczących składu miodu, będzie uproszczenie i że słuszne wyjaśnienia wynikną z zależności pomiędzy właściwościami miodu, a jego składem i między składem miodu, a jego pochodzeniem.”

Ogólnie przyjętym miernikiem wartości mineralnej żywności jest zawartość popiołu ogólnego. Oznaczenie zawartości, z uwagi na konieczność prowadzenia mineralizacji w stosunkowo niskiej temperaturze (do 550°C) oraz długotrwałe przygotowanie

próbki do spalania, jest czasochłonne. Trwa ono zbyt długo, by mogło służyć codziennej, rutynowej kontroli jakości i prawidłowości produkcji czy też kontroli wartości mineralnej gotowych wyrobów. Do oznaczenia zawartości składników mineralnych można wykorzystać przewodność elektryczną. Ze względu na prostotę i szybkość wykonania, jej pomiar wykorzystywany jest do oznaczania zawartości popiołu w cukrze [4]. Prowadzone były też próby stosowania metody konduktometrycznej do soków [6].

Celem badań było określenie współzależności między zawartością popiołu i przewodnością elektryczną właściwą różnych typów i odmian miodów pszczelich.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły miody pszczele zakupione w warszawskich sklepach specjalistycznych, pochodzące z różnych regionów Polski. Badano miody jasne: akacjowy (Bielsko-Biała, Poznań); lipowy (Sądecki Bartnik, Bielsko-Biała, Poznań); wielokwiatowy (Sądecki Bartnik, Bielsko-Biała, Poznań) i wrzosowy (Sądecki Bartnik, Bielsko-Biała, Poznań) oraz miody ciemne: gryczany (Sądecki Bartnik, Bielsko-Biała, Poznań); rzepakowy (Poznań); nektarowo-spadziowy (Bielsko-Biała) i spadziowy (Sądecki Bartnik, Poznań).

W materiale doświadczalnym oznaczano:

- popiół ogólny [1]. 5 g miodu odważano w porcelanowym tyglu wyprażonym wcześniej w piecu muflowym przez 1 h w 550°C i zważonym na wadze analitycznej. Następnie zawartość tygla spalano nad palnikiem pod wyciągiem, aż do zaniku wydzielania się białego dymu. Tygiel wstawiano do pieca i prażono przez 18 h w 550°C. Następnie studzono w eksykatorze i ważono na wadze analitycznej.
- przewodność elektryczną właściwą [1,5]. Naważkę miodu odpowiadającą 5 g suchej masy obliczono ze wzoru :

$$M = 5 \text{ g} \cdot 100 / MS$$

gdzie: M – naważka miodu, 5g;

MS – zawartość suchej masy w miodzie (= 100% – zawartość wody).

Odważony miód rozpuszczano w niewielkiej ilości wody, przenoszono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 25 ml i uzupełniano do kreski. Przygotowany roztwór miodu umieszczano w zlewce w łaźni wodnej o temperaturze. Naczynko konduktometryczne zanurzano w roztworze miodu. Pomiaru dokonywano, gdy temperatura roztworu wynosiła 20°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). Przewodnictwo oznaczano za pomocą konduktometru firmy Radelkis typ OK – 102/1.

Wyniki i dyskusja

Otrzymane wyniki zestawiono oddzielnie dla miodów jasnych (tab. 1) i miodów ciemnych (tab. 2), zgodnie z jednym z przyjmowanych w literaturze kryteriów podziału [8].

Tabela 1

Miody jasne.
Light honey.

Odmiana miodu Kind of honey	Sądecki bartnik		Bielsko-biała		Poznań	
	Przewodność Electric conductivity [10 ⁻⁴ s/cm]	Popiół Ash [g/100g]	Przewodność Electric conductivity [10 ⁻⁴ s/cm]	Popiół Ash [g/100g]	Przewodność Electric conductivity [10 ⁻⁴ s/cm]	Popiół Ash [g/100g]
Akacjowy Acacia	–	–	1,6 (1,14)*	0,05 (0,034)	1,6 (0,99)	0,07 (0,032)
Lipowy Lime	3,5 (0,02)	0,16 (0,062)	3,2 (0,94)	0,14 (0,038)	4,4 (1,20)	0,24 (0,046)
Wielokwiatowy Blossom	2,9 (1,17)	0,11 (0,039)	1,3 (1,27)	0,04 (0,009)	2,9 (1,11)	0,10 (0,035)
Wrzosowy Heather	5,0 (1,27)	0,36 (0,088)	3,6 (1,22)	0,18 (0,061)	–	–

* w nawiasach podano odchylenia standardowe.

Tabela 2

Miody ciemne.
Dark honey.

Odmiana miodu Kind of honey	Sądecki bartnik		Bielsko-biała		Poznań	
	Przewodność Electric conductivity [10 ⁻⁴ s/cm]	Popiół Ash [g/100g]	Przewodność Electric conductivity [10 ⁻⁴ s/cm]	Popiół Ash [g/100g]	Przewodność Electric conductivity [10 ⁻⁴ s/cm]	Popiół Ash [g/100g]
Gryczany Buckwheat	3,0 (0,85)*	0,08 (0,084)	2,5 (0,51)	0,08 (0,086)	2,6 (0,68)	0,11 (0,082)
Rzepakowy Rape	–	–	–	–	0,9 (0,83)	0,05 (0,081)
Nektarowo-spadziowy Blossom-honeydew	–	–	6,3 (1,39)	0,35 (0,094)	–	–
Spadziowy Honeydew	10,4 (2,32)	0,67 (0,182)	–	–	10,7 (2,92)	0,65 (0,148)

* w nawiasach podano odchylenia standardowe

Zawartość popiołu w badanych miodach wahała się w granicach od 0,04 do 0,67 g/100g. Wśród miodów jasnych (tab. 1) miód wielokwiatowy z Bielsko-Białej zawierał najmniej popiołu (0,04 g/100g), natomiast miód wrzosowy z „Sądeckiego Bartnika” najwięcej (0,36 g/100g). Zawartość popiołu w miodach ciemnych (tab. 2) wahała się od 0,05 g/100g w przypadku miodu rzepakowego z Poznania do 0,67 g/100g w przypadku miodu spadziowego z „Sądeckiego Bartnika”. Podobnie zróżnicowane wartości polskich miodów przedstawiła Rybak [10]. Badane przez nią miody akacjowe, rzepakowe i wielokwiatowe wykazywały minimalnie wyższą zawartość popiołu (odpowiednio 0,097%, 0,119% i 0,235%) niż miody tego samego pochodzenia botanicznego badane w niniejszej pracy (0,07%, 0,05% i 0,04–0,11%). Miody hiszpańskie zawierały średnio 0,19% popiołu [9]. W chorwackich miodach akacjowych [3] zawartość popiołu była znacznie niższa i mieściła się w zakresie od 0,012% do 0,068% (średnio 0,033%).

Dzięki obecności jonów w miodach przewodzą one prąd elektryczny. Konduktometryczny pomiar przewodności elektrycznej jest znacznie prostszy i mniej czasochłonny (15–20 minut) od oznaczania zawartości popiołu metodą mineralizacji. W pracy badano przewodność elektryczną właściwą 20% roztworów miodów. Najniższą wartość przewodności elektrycznej właściwej wśród miodów jasnych (tab. 1) stwierdzono w miodzie wielokwiatowym z Bielska-Białej ($1,3 \cdot 10^{-4}$ S/cm), natomiast najwyższą – w miodzie wrzosowym z „Sądeckiego Bartnika” ($5,0 \cdot 10^{-4}$ S/cm). W miodach ciemnych (tab. 2) przewodność elektryczna właściwa wahała się w dość szerokich granicach od $0,9 \cdot 10^{-4}$ S/cm (miód rzepakowy z Poznania) do $10,7 \cdot 10^{-4}$ S/cm (miód spadziowy z Poznania).

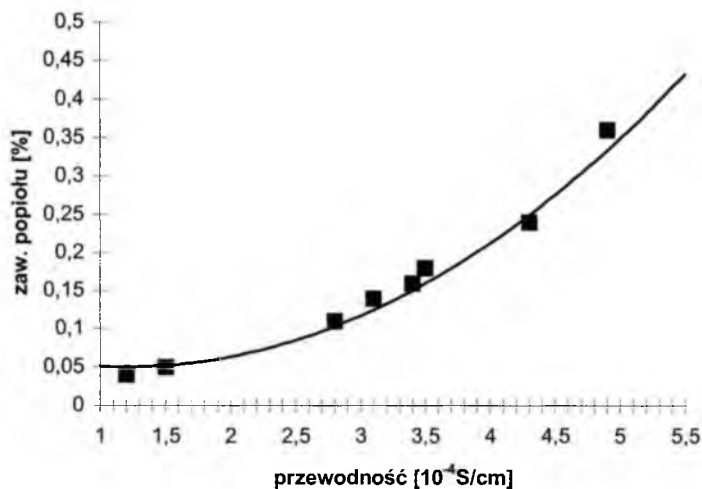
Rezultaty te potwierdzają dane przedstawione przez Rybak [10], według której przewodność elektryczna właściwa miodów jednodmianowych jest niższa. Stosunkowo wysoką przewodność elektryczną właściwą miodów lipowego i gryczanego można tłumaczyć różną domieszką spadzi liściastej, która prawie zawsze występuje w czasie nektarowania lipy i gryki [9], dzięki czemu znajduje się ona w tych miodach. Ponieważ miód spadziowy charakteryzuje się bardzo wysoką przewodnością elektryczną właściwą, domieszka tego miodu zdecydowanie podwyższa ten wskaźnik. Foldhazy i wsp. [2] podali, że przewodność elektryczna właściwa miodów akacjowych wahała się w zakresie $1,8$ – $2,4 \cdot 10^{-4}$ S/cm, a miodów lipowych $8,4 \cdot 10^{-4}$ S/cm. Miód spadziowy badany przez Popka [7] wykazywał przewodność elektryczną właściwą na poziomie $8,2 \cdot 10^{-4}$ S/cm. Otrzymane w niniejszej pracy wartości w przypadku miodów akacjowych i spadziowych są zbliżone do danych literaturowych, natomiast miodów lipowych – niższe niż podawane przez różnych autorów.

Stwierdzono istotną korelację pomiędzy zawartością popiołu a przewodnością elektryczną właściwą badanych miodów jasnych i ciemnych, o czym świadczą wysokie współczynniki determinacji wynoszące odpowiednio 98,525% – w przypadku mio-

dów jasnych i 98,245% – w przypadku miódów ciemnych. Badaną zależność najlepiej opisują równania o postaci wielomianów:

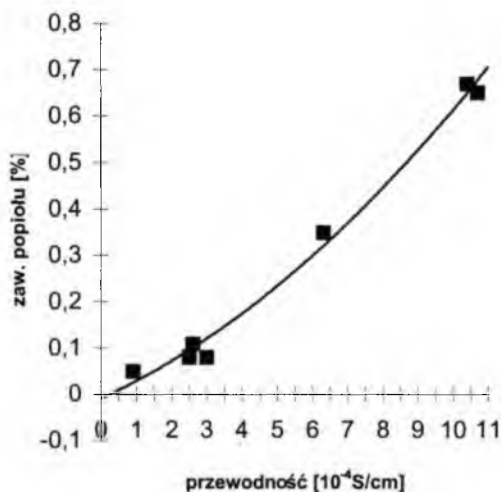
a) miody jasne (rys. 1)

$$y = 0,021\kappa^2 - 0,050\kappa + 0,080$$



Rys. 1. Zależność zawartości popiołu (g/100g) od przewodności elektrycznej właściwej (10^{-4} S/cm) w miódach jasnych.

Fig. 1. Relationship between ash content (g/100g) and electric conductivity (10^{-4} S/cm) in light honey.



Rys. 2. Zależność zawartości popiołu (g/100g) od przewodności elektrycznej właściwej (10^{-4} S/cm) w miódach ciemnych.

Fig. 2. Relationship between ash content (g/100g) and electric conductivity (10^{-4} S/cm) in dark honey.

b) miody ciemne (rys. 2)

$$y = 0,003\kappa^2 + 0,035\kappa - 0,009$$

gdzie: y – zawartość popiołu (g/100 g),

κ – przewodność elektryczna właściwa (10^{-4} S/cm).

Wielomiany te mogą być wykorzystywane do obliczenia zawartości popiołu w miodach. Przewidywane obszary predykcji, w których znajdują się wartości rzeczywiste zawartości popiołu przy poziomie ufności 95% dla skrajnych wartości przewodności elektrycznej właściwej podano w tabeli 3.

Tabela 3

Obszary predykcji dla miodów jasnych i ciemnych.
Prediction limits for light and dark honeys.

Miód Honey	Przewodność Electric conductivity [10^{-4} S/cm]	Obliczona zaw. popiołu Estimated ash content [%]	Obszary predykcji Prediction limits [$\alpha = 95\%$]	
			dolna granica lower	górną granica upper
Jasny Light	1,3	0,050	0,012	0,089
	5,0	0,349	0,307	0,391
Ciemny Dark	0,9	0,025	-0,099	0,149
	10,7	0,677	0,558	0,795

Wnioski

1. Istnieje ścisła współzależność między zawartością popiołu i przewodnością elektryczną właściwą, o czym świadczą wysokie współczynniki determinacji.
2. Obie metody oznaczania sumy składników mineralnych w żywności: oznaczanie popiołu ogólnego oraz pomiar przewodności właściwej są równoważne.
3. Wykorzystanie metody konduktometrycznej przez laboratoria kontroli technicznej pozwoli na bieżące sprawdzanie zawartości składników mineralnych w żywności, a tym samym na skuteczną kontrolę ich wartości biologicznej.

LITERATURA

- [1] Codex Stan 12-1981 FAO/WHO: Norme codex pour le miel, **12**, 1981, 39-55.
- [2] Foldhazi G., Amtmann M., Fodor P., Itzes A.: The physicochemical properties and composition of honey of different botanical origin, *Acta Alimentaria*, **25**, 1996, 237-256.

- [3] Petrović Z. T., Mandić M. L., Grgić J., Grgić Z.: Ash and chromium levels of some types of honey, *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **198**, 1994, 36-39.
- [4] Polska Norma PN-87/A-74855/08 Cukier. Metody badań. Oznaczanie zawartości popiołu.
- [5] Polska Norma PN-88/A-77626 Miód pszczeli.
- [6] Pieczonka W.: Konduktometryczna metoda oznaczania sumy składników mineralnych w pitnych sokach owocowych, *Przem. Spoż.*, **29**, 1975, 439-442.
- [7] Poppek S.: Badania fizykochemicznych parametrów jakości miodu spadziowego, *Żywność minimalnie przetworzona - Materiały Konferencji Naukowej, PTTŻ Kraków, 1997*, 199-200.
- [8] Encyklopedia pszczelarska, praca zbiorowa (Bornus L. – red.) Warszawa 1989, PWRiL.
- [9] Rodriques-Otero J L., Paseino P., Simal J., Terrotillos L., Cepeda A.: Silicon, phosphorus, sulphur, chlorine and contents of Spanish commercial honeys, *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **200**, 1995, 233-234.
- [10] Rybak H.: Charakterystyka chemiczna krajowych miódów odmianowych, *Pszczel. Zesz. Nauk.*, **30**, 1986, 3-16.
- [11] White J. W. Jr.: *Bee World*, **3**, 1957, 57.

USAGE OF CONDUCTOMETRY FOR ASH CONTENT MEASUREMENT IN HONEY

S u m m a r y

The aim of this research was to estimate the relation between ash content and electric conductivity in honey. Samples of different honeys (light and dark) from Poland were the research material. Content of ash, depending on the kind of honey, was from 0.04 to 0.67 g/100 g and electric conductivity from 0.9 to $10.7 \cdot 10^{-4}$ S/cm, respectively. Statistical analysis proved a good correlation between ash content and electrical conductivity. Measurement of electrical conductivity is quick and easy, might be applied for measurement of ash content in honey. ☒

EWA MALCZYK

WPLYW SYSTEMU ŻYWIENIA KURCZĄT NA PROCESY OKSYDACYJNE ZACHODZĄCE W MIĘSIE PRZECHOWYWANYM CHŁODNICZO

S t r e s z c z e n i e

Analizowano wpływ żywienia kurcząt paszą z dodatkiem olejów: sojowego, rzepakowego lub lnianego oraz witaminy E, jako antyoksydantana, na przebieg procesów oksydacyjnych w lipidach oraz zmiany smaku i zapachu mięsa drobiowego. Wykazano, że procesy oksydacyjne nasilają się w trakcie przechowywania (trzykrotny wzrost wskaźnika TBA). Dodatek witaminy E istotnie wstrzymał proces oksydacji tłuszczów. Zawartość WNKT z grupy n-3 w lipidach mięśni piersiowych zwiększyła się przy dodatku oleju rzepakowego i lnianego. Dodatek oleju sojowego był głównie źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy n-6. Najbardziej preferowane przez oceniających były mięśnie kurcząt żywionych paszą z dodatkiem oleju sojowego i witaminy E. Po 4 dniach chłodniczego przechowywania, walory smakowo-zapachowe badanych mięśni uległy pogorszeniu. Zaobserwowano nasilenie takich wyróżników smaku i zapachu, jak: jełki, rybi, obcy oraz metaliczny.

Wstęp

Procesy oksydacji mają niekorzystny wpływ na jakość produktów spożywczych, doprowadzają one bowiem do obniżenia wartości biologicznej i odżywczej tłuszczów poprzez rozkład wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) oraz ich izomerizację z formy cis w trans. Konsekwencją tych zmian jest pogorszenie właściwości sensorycznych mięsa, a w dalszym etapie cech funkcjonalnych białek [3, 8, 14, 26].

Powstawanie obcego niepożądanego smaku i zapachu mięsa *Warmed Over Flavour (WOF)* dotyczy szczególnie mięsa drobiowego przechowywanego w warunkach chłodniczych po obróbce termicznej [10, 19].

Mięso drobiowe spośród innych rodzajów mięsa jest szczególnie podatne na procesy oksydacyjne, ponieważ generalnie lipidy drobiu wykazują wyższy stopień nienasylenia w porównaniu z mięsem dużych zwierząt rzeźnych [2, 17, 23]. Ponadto wpro-

wadzenie olejów roślinnych do paszy drobiu, aby podnieść zawartość WNKT w mięsie, powoduje wzrost podatności lipidów mięsa na procesy utleniania.

Utlennianie lipidów oraz powstawania WOF w gotowanym mięsie oraz w produktach mięsnych można ograniczyć poprzez dodatek do mięsa niektórych związków chemicznych, np. azotynów, fosforanów, cytrynianów, fitynianów oraz syntetycznych lub naturalnych przeciwutleniaczy [15, 19]. W ostatnich latach odnotowuje się w literaturze [21, 26, 28, 29] coraz to większe zainteresowanie właściwościami antyoksydacyjnymi naturalnych substancji, takich jak tokoferole, które są bardziej akceptowane przez konsumentów aniżeli antyoksydanty syntetyczne. Dodatek tokoferoli do paszy powoduje, że zwiększa się ich ilość w tkance mięśniowej, co wpływa nie tylko na stabilność oksydacyjną lipidów mięsa, ale również polepsza smak i zapach.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu dodatku do paszy kurcząt olejów roślinnych (sojowego, rzepakowego lub lnianego) oraz witaminy E (α -tokoferolu), jako antyoksydanta, na przebieg procesów oksydacyjnych w lipidach mięśni piersiowych i nóg, a tym samym na kształtowanie walorów smakowo-zapachowych mięsa.

Material i metody badań

Badania przeprowadzono na 300 sztukach kurcząt brojlerów z linii Vedetta, które zostały podzielone na 6 grup w zależności od systemu ich żywienia (tab. 1). Kurczęta żywiono przez 6 tygodni mieszanką DKA Starter z dodatkiem olejów: sojowego, rzepakowego lub lnianego oraz witaminy E, jako antyoksydantana. Doświadczenie żywieniowe zostało przeprowadzone w Zakładzie Doświadczalnym SGGW w Brwinowie.

Przedmiotem analizy były mięśnie piersiowe i mięśnie nóg kurcząt, które pobrano do badań po 24 godzinach *post mortem*. Materiał badawczy podzielono na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowiły mięśnie świeże, a drugą mięśnie piersiowe oraz nóg po obróbce termicznej (pieczeniu) w temp. 180°C w czasie 1 godziny. Następnie próby zostały zapakowane w aluminiową folię (bez ewakuacji powietrza) i przechowywane w temp. +4°C przez okres 0, 4 i 6 dni.

W badanych mięśniach oznaczono zawartość tłuszczu ogólnego metodą Soxhleta [22] oraz zawartość witaminy E (w formie α -tokoferolu i octanu α -tokoferolu) metodą HPLC na kolumnie RP-18 z detektorem skaningowym fluorescencyjnym [7, 31]. Następnie z tkanki mięśniowej jasnej i ciemnej wyekstrahowano tłuszcz według metody Folcha [9] i poddano analizie na zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych z uwzględnieniem kwasów z grupy n-3 i n-6 metodą chromatografii gazowej (chromatograf gazowy HP 5890 Hewlett Packard) na HP-INNOWAX 30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m, temp: injektor 220°C, detektor 250°C; identyfikację maksimów uzyskanych z analizowanych próbek tłuszczu przeprowadzono na drodze porównania ich względ-

nych czasów retencji z względnymi czasami retencji maksimum otrzymanych w wyniku chromatografowania roztworu standardów). Zmiany oksydacyjne w lipidach mięśni oznaczono na podstawie wskaźnika TBA [20, 30].

Badania sensoryczne smaku i zapachu mięsa przeprowadzono w skali 5-punktowej oraz metodą profilowania sensorycznego [4, 5]. Oceny sensorycznej dokonał 10-osobowy wyszkolony zespół panelowy.

Wszystkie uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statgraphics 5.0.

Tabela 1

Układ doświadczenia – program żywieniowy.

Experimental design – feeding system.

Grupa Group	Zawartość energii metabolicznej Level of metabolise energy [kcal/kg]	Zawartość białka Protein level [%]	Dodatek oleju Oil supplement [%/kg paszy] [%/kg feed]	Dodatek witaminy E Vit.E supplement [%]	Zawartość tłuszczu Fat level [%]
I	3113	21,3	Olej sojowy 2,8	-	5,5
II	3112	21,3	Olej sojowy 2,8	0,02	5,5
III	3113	21,3	Olej rzepakowy 2,8	-	5,5
IV	3112	21,3	Olej rzepakowy 2,8	0,02	5,5
V	3113	21,3	Olej lniany 2,8	-	5,5
VI	3112	21,3	Olej lniany 2,8	0,02	5,5

Omówienie i dyskusja wyników

Skład lipidów mięsa kurcząt brojlerów

Zawartość tłuszczu w mięśniach jasnych i ciemnych zamieszczono w tab. 2, z której wynika, że dodatek oleju sojowego do paszy wpłynął na większe otłuszczenie mięśni piersiowych niż dodatek oleju rzepakowego. Równomierne otłuszczenie mięśni (piersiowych i nóg) w porównaniu z innymi grupami badawczymi odnotowano w przypadku obu mięśni kurcząt żywionych dietą z dodatkiem oleju lnianego. Natomiast wzbogacenie diety kurcząt olejem rzepakowym spowodowało istotny wzrost lipidów w

mięśniach ciemnych (nóg). Podobny rezultat badań uzyskali Lin i wsp. [15]. Nie wszystkie jednak wyniki badań wskazują na zależność pomiędzy dodatkiem oleju rzepakowego w diecie, a zwiększeniem zawartości tłuszczu tkankowego. Na przykład Hulan i wsp. [12] nie stwierdzili związku pomiędzy ilością dodanego oleju rzepakowego do paszy, a stopniem otluszczenia mięśni kurcząt.

Tabela 2

Zawartość tłuszczu w mięśniach piersiowych i nóg.
Fat content in breast and leg muscles.

Grupa Group	Tłuszcz ogólny [%] / Total fat [%]	
	Mięśnie piersiowe Breast muscles	Mięśnie nóg Leg muscles
I	1,49	5,29
II	2,21	5,57
III	1,48	6,62
IV	1,40	7,22
V	1,60	6,33
VI	1,44	5,76
S	1,85 ^b	5,43 ^a
R	1,44 ^a	6,92 ^c
L	1,52 ^{ab}	6,20 ^b
E	1,69 ^a	6,18 ^a
B	1,52 ^a	6,18 ^a

R, S, L – rodzaj dodawanego oleju do paszy, R-olej rzepakowy, S-olej sojowy, L-olej lniany

R, S, L – kind of oil added to feed, R-rape oil, S-soya oil, L-linseed oil

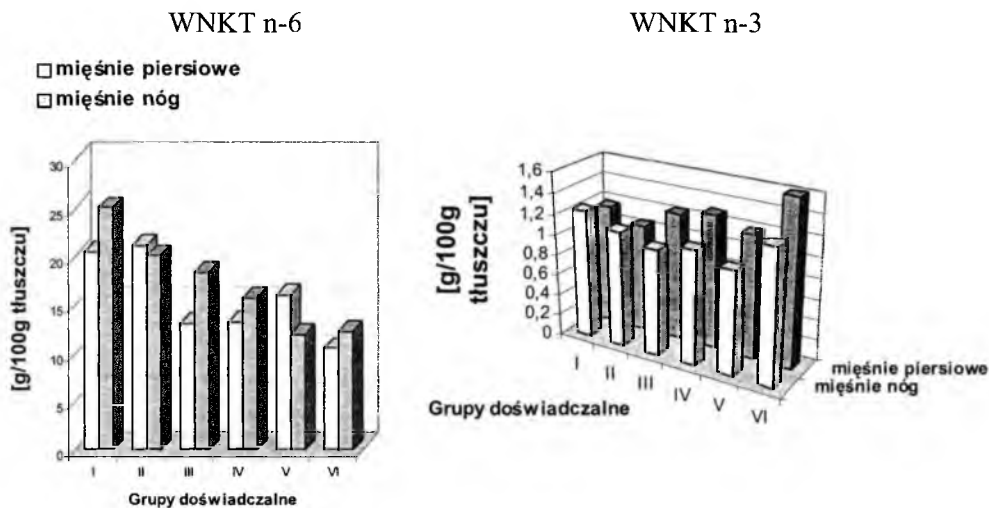
E – grupa z dodatkiem wit. E; group with addition of vitamin E

B – grupa bez dodatku wit. E; group without addition of vitamin E

a, b, c – wystąpienie wspólnej litery przy indeksach średnich wskazuje na brak różnicy statystycznie istotnej przy $P \leq 0,05$

a, b, c – the same letter in indices of averages means lack of statistically significant difference at $P \leq 0,05$

Wielu badaczy [1, 16, 25] dowiodło, że skład kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej odzwierciedla skład paszy podawanej kurczętom w czasie wzrostu. Przeprowadzone badania własne również wykazały, że dieta w pewnym stopniu modyfikuje skład chemiczny lipidów. Okazało się, że dodatek oleju sojowego do paszy (jako głównego źródła nienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy n-6) wpłynął przede wszystkim na wzrost poziomu kwasu linolowego (C18:2) w lipidach mięśni nóg (24,8%) i w nieco mniejszym stopniu w lipidach mięśni piersiowych (21,0%) (rys. 1). Podobną zależność wykazali w swych badaniach Lin i wsp. [15], którzy dodają do



Rys. 1. Poziom WNKT n-6 i n-3 w mięśniach kurcząt. Ogólny poziom WNKT w mięśniach piersiowych i nóg wynosił 12,15–26,30 g/100 g tłuszczu.

Fig. 1. PUFA n-6 and n-3 content in chicken muscles. Total content PUFA in breast and leg muscles ranged 12,15-26,30 g/100 g fat.

paszy 5,5% (czyli więcej o 2,7% aniżeli w badaniach własnych) częściowo uwodornionego oleju sojowego oznaczyli zawartość tego kwasu w mięśniach jasnych i ciemnych kurcząt na poziomie 28,9–33,8%. Inni badacze [11] stosując również dodatek oleju sojowego do diety kurcząt na poziomie 3,5%, zaobserwowali wzrost nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-6, jednak poziom kwasu linolowego w mięśniach, a szczególnie w mięśniach udowych był zdecydowanie niższy aniżeli w niniejszych badaniach i wynosił tylko 6,8%. Świadczyć to może o istnieniu zależności pomiędzy zawartością WNKT n-6 w tkance mięśniowej, a zawartością WNKT n-6 zawartych w paszy. Podobne relacje obserwowano odnośnie zawartości WNKT n-3 w tkance mięśniowej – im wyższa była zawartość w paszy tłuszczów zawierających kwasy tłuszczowe z rodziny n-3, tym wyższa była ich konwersja do lipidów mięśni [1, 16, 25]. W badaniach, własnych oleje: lniany i rzepakowy dodawane do pasz były dobrymi nośnikami nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3, co zaobserwowano szczególnie w lipidach mięśni jasnych. Natomiast wpływ na zawartość WNKT n-3 w lipidach mięśni nóg miały zarówno oleje lniany i rzepakowy, jak i olej sojowy. Z uwagi na niski poziom dodawanych olejów do paszy (2,8%) zawartość WNKT n-3 wynosiła w mięśniach jasnych 1,0–1,6%, a w mięśniach ciemnych 1,0–1,3% (rys. 1). Potwierdzają to badania Jensena i wsp. [13], którzy żywiąc kurczętą dietą wzbogaconą w olej rzepakowy w ilości 9% (czyli więcej o 6,2% aniżeli w badaniach własnych) i olej sojowy na poziomie 2%, odnotowali wyższy wzrost zawartości kwasu linolenowego (C18:3 n-3) zarówno w mięśniach piersiowych (3,45%), jak i w mięśniach udowych

(6,18%). Ponadto w niniejszych badaniach zaobserwowano, że w grupach (IV, VI), w których kurczętom dodawano do paszy witaminę E, poziom WNKT n-3 był nieco wyższy niż w grupach bez dodatku witaminy E (III, V). Oznaczony wyższy poziom nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny n-3 w wymienionych grupach doświadczalnych, najprawdopodobniej wynikał z antyoksydacyjnego działania dodanego alfa-tokoferolu do paszy.

Procesy oksydacyjne

Wielu autorów uważa, że wprowadzenie olejów roślinnych, takich jak sojowego, rzepakowego, czy lnianego lub oleju rybiego do paszy może spowodować wzrost podatności lipidów mięsa na procesy utleniania z uwagi na zwiększony stopień ich nienasylenia [2, 15, 16, 25].

Tabela 3

Wartości wskaźnika TBA (w zależności od czasu przechowywania i dodatku witaminy E).

TBA value (effect of storage time and vitamin E supplement).

Grupa Group	Mięśnie piersiowe Breast muscles				Mięśnie nóg Leg muscles				
	Ś-0 dni	P-0 dni	P-4 dni	P-6 dni	Ś-0 dni	P-0 dni	P-4 dni	P-6 dni	
I	0,705	0,980	2,994	3,232	0,839	1,087	3,234	3,982	
II	0,694	0,568	1,610	2,001	0,846	0,649	1,967	2,556	
III	1,001	0,923	2,038	2,918	1,143	0,909	2,129	3,023	
IV	0,669	0,655	0,936	2,031	0,743	0,679	1,705	2,377	
V	1,259	1,063	2,004	3,001	1,357	1,430	3,619	4,123	
VI	0,950	0,648	1,123	2,217	1,143	0,949	1,165	2,459	
<u>Dodatek witaminy E:</u> <u>Vitamin E supplement:</u>									
E		1,200 ^a				1,436 ^a			
B		1,844 ^b				2,240 ^b			
<u>Czas przechowywania [dni]</u> <u>Time of storage [days]:</u>									
Ś-0		0,881 ^a				1,011 ^a			
P-0		0,856 ^a				0,950 ^a			
P-4		1,783 ^b				2,303 ^b			
P-6		2,568 ^c				3,087 ^c			

E – grupa z dodatkiem wit. E; group with addition of vitamin E

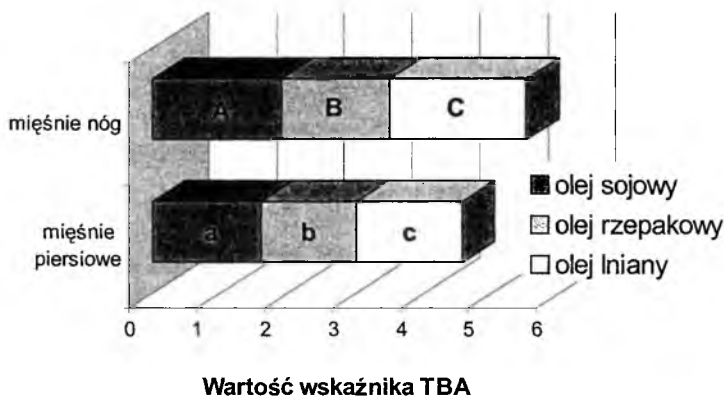
B – grupa bez dodatku wit. E; group without addition of vitamin E

Ś-0 – mięso świeże; raw muscle

P-0, P-4, P-6 dni, days – mięso pieczone, przechowywane w +4°C; roasted broiler muscles stored at +4°C

a, b, c – wystąpienie wspólnej litery przy indeksach średnich wskazuje na brak różnicy statystycznie istotnej przy $P \leq 0,05$

a, b, c – the same letter in indices of averages means lack of statistically significant difference at $P \leq 0,05$



a, b, c lub A, B, C – różne litery wskazują na statystycznie istotną różnicę przy $P < 0,05$

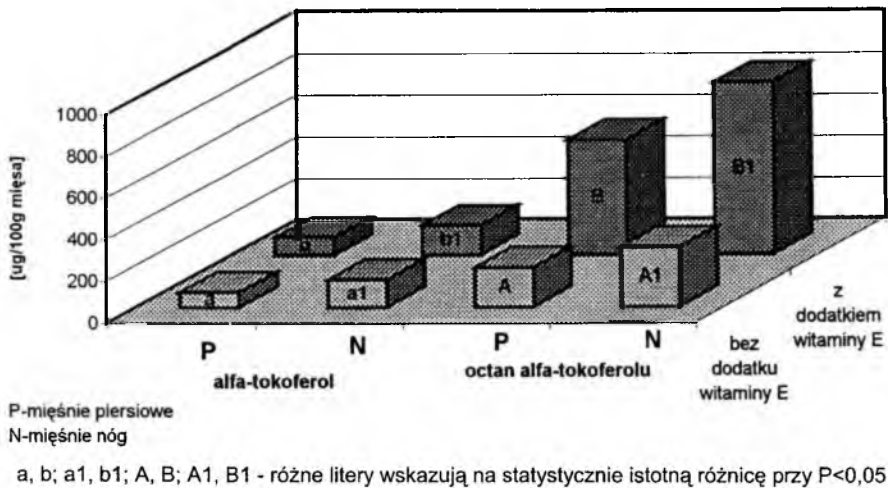
Rys. 2. Wpływ rodzaju oleju dodawanego do paszy na wartość wskaźnika TBA w mięśniach broilerów.
Fig. 2. Effect of kind of oil on TBA value of broiler meat.

W badaniach własnych stabilność oksydacyjną badanego tłuszczu oceniono na podstawie wskaźnika TBA, a uzyskane wyniki zestawiono w tab. 3 i na rys. 2.

Wykazano istotny wpływ czasu przechowywania ($+4^{\circ}\text{C}$) na wzrost wartości wskaźnika TBA w badanych mięśniach. Dynamika zmian wartości tego wskaźnika była nieco wyższa w lipidach mięśni piersiowych (3,5x) niż w lipidach mięśni nóg (3x), co jest zgodne z badaniami innych autorów [3, 17]. Utlenianie lipidów mięsa jest inicjowane przez wysoko nienasyconą frakcję fosfolipidową budującą przede wszystkim błony komórkowe, której lipidy mięśni piersiowych (jasnych) zawierają w swoim składzie więcej aniżeli lipidy mięśni nóg (ciemnych) [10]. Przechowywanie w warunkach chłodniczych przez okres do 6 dni miało generalnie negatywny wpływ na dynamikę procesów utleniania badanych mięśni. W czasie chłodniczego przechowywania znaczne zaawansowanie procesów utleniania, wyrażone wskaźnikiem TBA, zaobserwowano zarówno w mięśniach jasnych, jak i ciemnych brojlerów żywionych dietą z dodatkiem oleju lnianego, w mniejszym stopniu przy dodatku oleju sojowego. Natomiast kurczęta, które żywiono dietą z dodatkiem oleju rzepakowego, charakteryzowały się niższymi wartościami wskaźnika TBA (tab. 3). Wyższa oporność na procesy utleniania lipidów z mięśni kurcząt żywionych paszą z dodatkiem oleju rzepakowego wynikała prawdopodobnie z wyższej zawartości w lipidach tych mięśni nasyconych kwasów tłuszczowych, które są mniej podatne na zmiany oksydacyjne. Niższe wartości wskaźnika TBA oznaczyli także Mercier i wsp. [18] w mięśniach indyków żywionych dietą z dodatkiem oleju rzepakowego aniżeli w przypadku indyków, którym dodawano do paszy olej sojowy.

Założenia badawcze niniejszego doświadczenia przewidywały dodatek do paszy α -tokoferolu, jako naturalnego antyoksydanta. Rola witaminy E okazała się wysoce zadawalająca. Wprowadzenie do diety badanych kurcząt, oprócz olejów roślinnych, również witaminy E, miało korzystny wpływ nie tylko na stabilność oksydacyjną lipidów, ale też na cechy sensoryczne mięsa świeżego, pieczonego i przechowywanego w warunkach chłodniczych. Oznaczono konsekwentnie niższe wartości wskaźnika TBA w mięśniach kurcząt, które żywiono paszą z dodatkiem alfa-tokoferolu (grupy: II, IV, VI) aniżeli w mięśniach brojlerów z grup (I, III, V) bez dodatku witaminy E. Wyniki zestawiono w tabeli 3. Podobną tendencję zmian odnotowali inni autorzy [24, 28], którzy stwierdzili, że zawartość aldehydu malonowego w gotowanych mięśniach nóg kurcząt i w mięśniach piersiowych indyków obniża się wraz ze wzrostem ilości dodawanego alfa-tokoferolu do paszy. Poziom wskaźnika TBA był odwrotnie proporcjonalny do poziomu dodawanej witaminy E. Dodatek witaminy E opóźnia oksydację lipidów, mierzoną wskaźnikiem TBA, bez względu na rodzaj dodawanego tłuszczu w diecie [18].

W wyniku wzbogacania diety kurcząt witaminą E wzrasta jej udział w mięśniach. Poziom konwersji witaminy E w badanych mięśniach wyniósł około 2,0%. Mięśnie ciemne akumulowały więcej witaminy E niż mięśnie jasne (rys. 3). Mięśnie nóg zawierają stosunkowo więcej tłuszczu niż mięśnie piersiowe, dlatego alfa-tokoferol, jako rozpuszczalny w tłuszczu, może koncentrować się w większej ilości w mięśniach ciemnych. Potwierdziły to również wyniki innych badaczy [15, 25, 27].



Rys. 3. Zawartość α -tokoferolu i octanu α -tokoferolu w mięśniach kurcząt żywionych paszą wzbogaconą w oleje roślinne.

Fig. 3. α -tocopherol and acetate α -tocopherol content in muscles of chickens fed with diet enriched with vegetable oils.

Ocena sensoryczna

Wyniki przeprowadzonej oceny sensorycznej zamieszczono w tabeli 4.

Na smak i zapach mięśni jasných, jak i ciemnych miał istotny wpływ rodzaj dodanego oleju (sojowy, rzepakowy lub lniany) do paszy. Najbardziej preferowane przez oceniających były mięśnie piersiowe i mięśnie nóg kurcząt żywionych paszą z dodatkiem oleju sojowego (bez lub z dodatkiem witaminy E). Średnia punktacja w skali 5-pkt. wynosiła 3,1–4,3 pkt. Przy dodatku oleju rzepakowego lub lnianego do paszy, zmiany smaku i zapachu mięśni były bardziej wyczuwalne i uzyskały one niższą punktację w porównaniu do mięśni kurcząt, które w diecie miały dodatek oleju sojowego. Natomiast w grupach, gdzie równocześnie z olejem rzepakowym lub lnianym była dodawana witamina E do paszy, zaobserwowano poprawę właściwości sensorycznych mięsa. Porównując wyniki oceny sensorycznej badanych mięśni z odpowiednimi wartościami wskaźnika TBA, można jednoznacznie stwierdzić, że dodatek witaminy E zmniejsza tempo procesów oksydacyjnych przez co polepsza cechy sensoryczne (smak i zapach) mięsa nie tylko świeżego, ale również po obróbce termicznej i chłodniczym przechowywaniu. Do podobnych wniosków doszli wcześniej inni badacze [6, 21, 24, 25, 28].

Tabela 4

Ocena sensoryczna smaku i zapachu w skali 5-punktowej.
Sensory evaluation of meat (5-point scale).

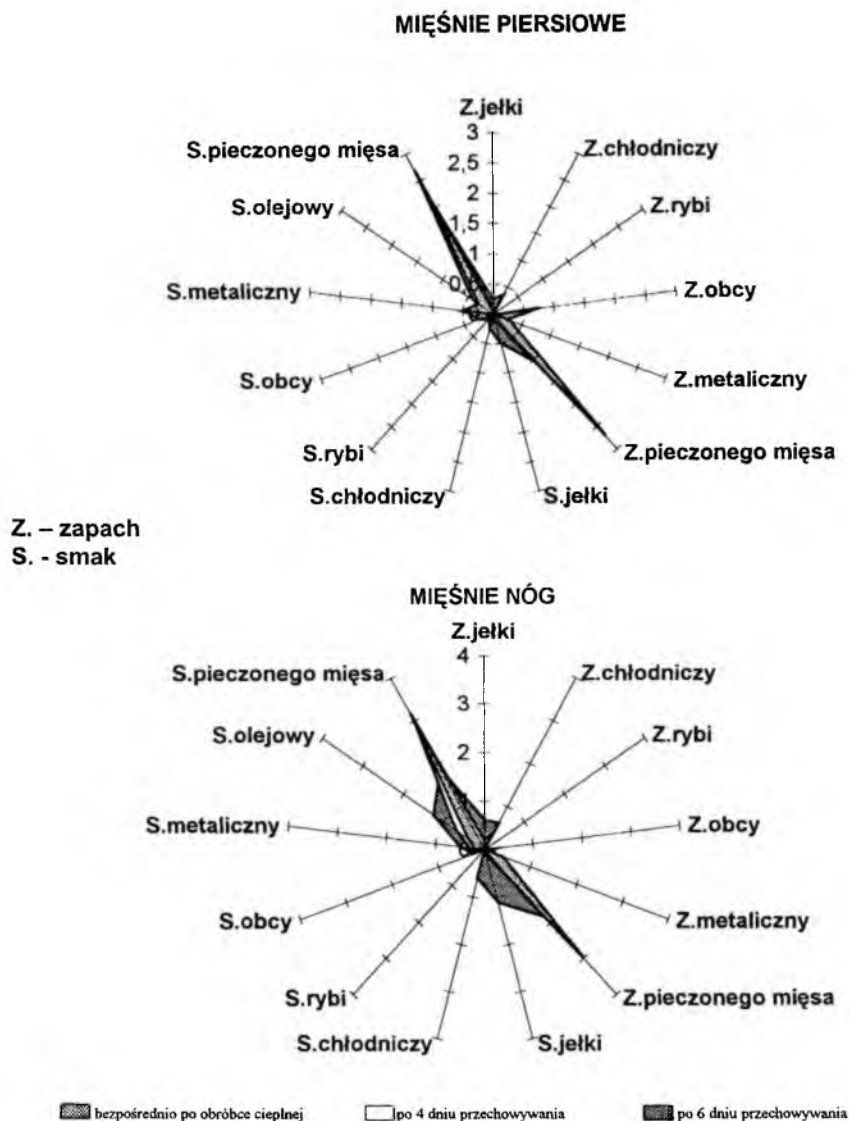
Grupa Group	Mięśnie piersiowe Breast muscles						Mięśnie nóg Leg muscles					
	SMAK TASTE			ZAPACH ODOUR			SMAK TASTE			ZAPACH ODOUR		
	0	4	6	0	4	6	0	4	6	0	4	6
	I	3,8 ^a	3,9 ^c	3,3 ^b	4,1 ^a	3,8 ^a	3,5 ^a	4,0 ^a	3,9 ^b	3,1 ^a	4,1 ^a	3,9 ^a
II	3,9 ^a	3,9 ^c	3,6 ^c	4,3 ^a	3,9 ^a	3,6 ^a	4,2 ^a	4,1 ^b	3,4 ^a	4,1 ^a	4,1 ^a	3,4 ^a
III	3,7 ^a	3,1 ^{ab}	3,3 ^b	3,6 ^a	3,4 ^a	2,6 ^a	4,1 ^a	3,3 ^{ab}	2,7 ^a	4,0 ^a	3,5 ^a	2,5 ^a
IV	3,4 ^a	3,6 ^{bc}	2,4 ^a	3,8 ^a	3,5 ^a	2,9 ^a	3,7 ^a	3,7 ^{ab}	2,8 ^a	4,1 ^a	3,7 ^a	2,8 ^a
V	3,5 ^a	2,8 ^a	2,7 ^a	4,1 ^a	3,0 ^a	2,9 ^a	3,7 ^a	2,9 ^a	2,2 ^a	3,8 ^a	3,2 ^a	2,5 ^a
VI	3,5 ^a	3,0 ^{ab}	3,0 ^{ab}	4,1 ^a	3,5 ^a	3,1 ^a	3,9 ^a	3,0 ^a	2,5 ^a	4,1 ^a	3,2 ^a	2,6 ^a

0, 4, 6 dni, days – mięso pieczone, przechowywane w +4°C; roasted broiler muscles stored at +4°C

a, b, c – wystąpienie wspólnej litery przy indeksach średnich wskazuje na brak różnicy statystycznie istotnej przy $P \leq 0,05$

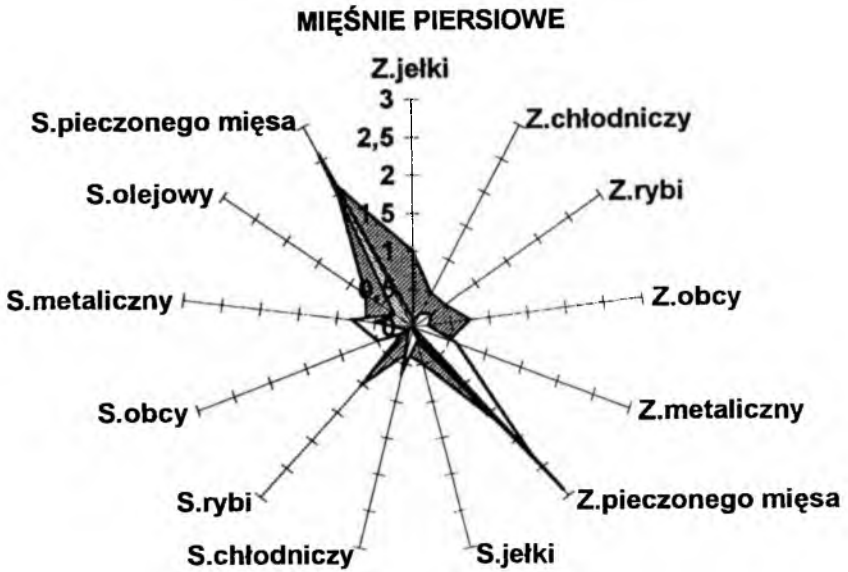
a, b, c – the same letter in indices of averages means lack of statistically significant difference at $P \leq 0,05$

Ocena sensoryczna przeprowadzona na podstawie profilowania sensorycznego pozwoliła określić zmiany intensywności w czasie przechowywania niektórych wyróżników smaku i zapachu, np. w kierunku nasilenia się smaku i zapachu jełkiego, chłodniczego, rybiego, obcego, metalicznego i olejowego. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie graficznej na rys. 4–6.

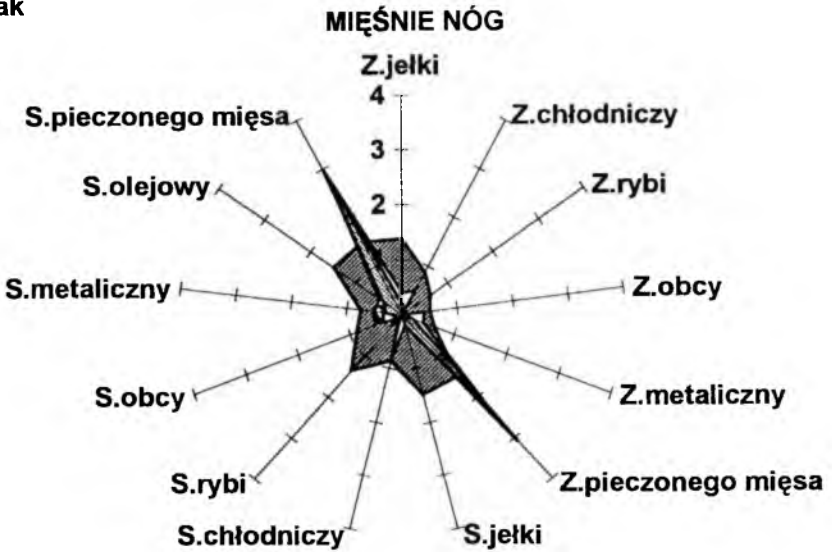


Rys. 4. Profilogramy smaku i zapachu mięśni brojlerów żywionych paszą wzbogaconą w olej sojowy i witaminę E.

Fig. 4. Sensory profile of breast and leg muscles of chickens fed with standard diet enriched with soya oil and vitamin E.



Z. – zapach
S. - smak



▨ bezpośrednio po obróbce cieplnej

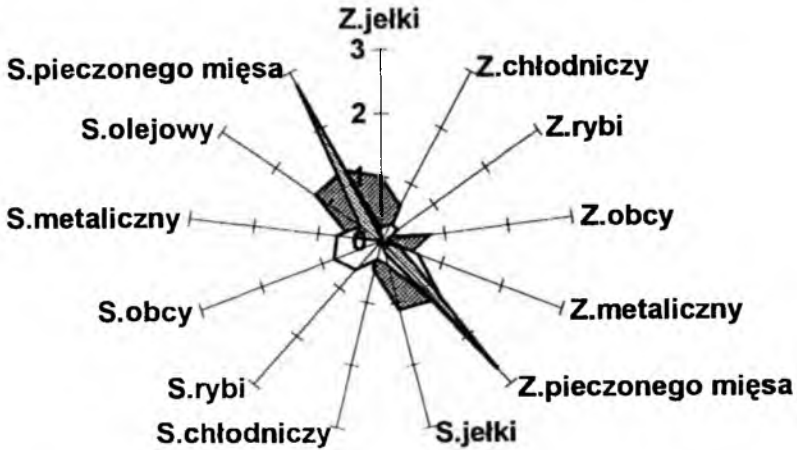
□ po 4 dniu przechowywania

■ po 6 dniu przechowywania

Rys. 5. Profilogramy smaku i zapachu mięśni brojlerów żywionych paszą wzbogaconą w olej rzepakowy i witaminę E.

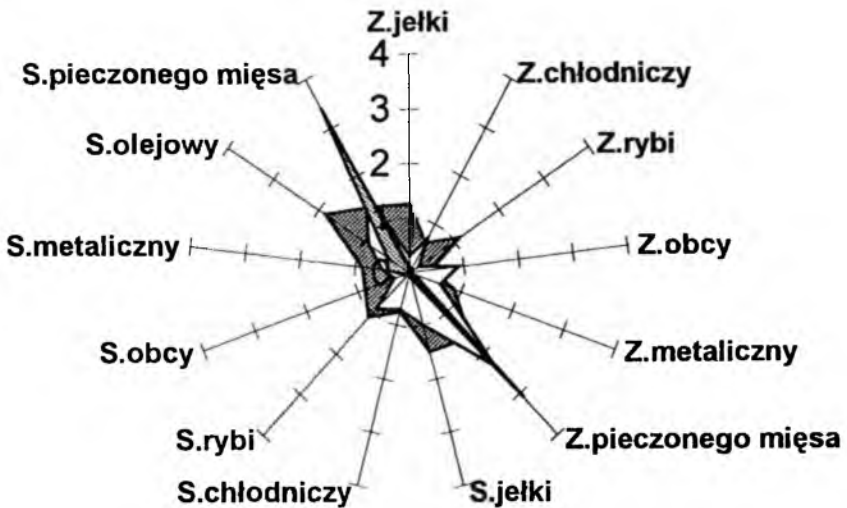
Fig. 5. Sensory profile of breast and leg muscles of chickens fed with standard diet enriched with rape oil and vitamin E.

MIĘŚNIE PIERSIOWE



Z. – zapach
S. - smak

MIĘŚNIE NÓG



Rys. 6. Profilogramy smaku i zapachu mięśni brojlerów żywionych paszą wzbogaconą w olej lniany i witaminę E.

Fig. 6. Sensory profile of breast and leg muscles of broilers fed with standard diet enriched with linseed oil and vitamin E.

Profilogramy smaku i zapachu są zróżnicowane w zależności od rodzaju mięśni. Zdecydowanie wyższy przyrost niekorzystnych wyróżników smaku i zapachu w czasie przechowywania odnotowano dla mięśni ciemnych. Powodem tego była prawdopodobnie wyższa zawartość tłuszczu ogółem w tych mięśniach aniżeli w mięśniach piersiowych. Bowiem tłuszcz jest nośnikiem substancji smakowo-zapachowych w mięsie.

Dodatek do diety kurcząt oleju nie pozostał bez wpływu na występowanie poszczególnych wyróżników smaku i zapachu. Stwierdzono pojawienie się smaku i zapachu jełkiego, rybiego i metalicznego w mięśniach piersiowych i nóg w grupie z dodatkiem oleju rzepakowego i lnianego (rys. 5 i 6), co znalazło swoje odbicie w ocenie sensorycznej. Ponadto panel oceniający oznaczył obcy, nietypowy posmak dla mięsa drobiowego, a charakterystyczny dla nasion lnu, w mięśniach kurcząt żywionych paszą z dodatkiem oleju lnianego.

Pod względem badanych wyróżników sensorycznych (smak i zapach) odnotowano najwyższe oceny dla obu mięśni kurcząt żywionych dietą z dodatkiem oleju sojowego i witaminy E. Zaobserwowano również, że dodana witamina E do paszy kurcząt w ilości 200 mg/kg osłabiła nasilenie się obcych wyróżników smaku i zapachu w czasie chłodniczego przechowywania, a tym samym wpłynęła korzystnie na właściwości sensoryczne badanego mięsa kurcząt. Blum i wsp. [6] stwierdzili, że zapach mięsa brojlerów żywionych dietą kontrolną zawierającą 20 mg/kg w paszy α -tokoferolu znacząco pogorszył się podczas 12 dniowego przechowywania w temp. 4°C, podczas gdy zapach mięśni kurcząt żywionych dietą z dodatkiem 160 mg/kg α -tokoferolu pozostał niezmienny do końca okresu przechowywania. Na podstawie powyżej przedstawionych wyników z badań własnych, jak i badań ww. autorów nasuwa się jednoznaczny wniosek związany z dodatkiem witaminy E. Im wyższa jest dawka witaminy E dodawanej do paszy, tym szybsze i skuteczniejsze jest jej działanie w mięsie. Stwierdzono, że podczas 6 dni przechowywania chłodniczego niepożądane zmiany smaku i zapachu były notowane we wszystkich próbach, jednak w próbach bez dodatku α -tokoferolu panel sensoryczny stwierdził występowanie WOF już po 4 dniach przechowywania w 4°C.

Podsumowanie

Reasumując wyniki z przeprowadzonych badań można stwierdzić, że na przebieg procesów oksydacyjnych w lipidach mięśni zdecydowanie największy wpływ miał czas chłodniczego przechowywania, następnie rodzaj oleju dodanego do paszy. Oleje sojowy, rzepakowy i lniany są nośnikami WNKT do tkanki mięśniowej, a w tym bardzo ważnych z punktu żywieniowo-zdrowotnego WNKT z grupy n-3 i n-6. Podając kurczętom w diecie witaminę E równocześnie z olejami roślinnymi, uzyskano spowolnienie procesów oksydacyjnych w tłuszczu tkankowym oraz poprawienie walorów

sensorycznych mięsa kurcząt. Krytycznym dniem, w którym nasiliły się zmiany smaku i zapachu był 5 dzień przechowywania chłodniczego.

Praca wykonana w ramach grantu KBN, Nr PB055/P06/97/12

LITERATURA

- [1] Ajuyah A.O., Lee K.H., Hardin R.T., Sim J.S.: Influence of dietary full-fat seeds and oils on total lipid, cholesterol and fatty acid composition of broiler meats. *Can. J. Anim. Sci.*, **71**, 1991, 1011.
- [2] Ang C.Y.W.: Comparison of broiler tissues for oxidative changes after cooking and refrigerated storage. *J. Food Sci.*, **53**, 1988, 1072.
- [3] Ang C.Y.W., Lyon B.G.: Evaluations of warmed-over flavor during chill storage of cooked broiler breast, thigh and skin by chemical, instrumental and sensory methods. *J. Food Sci.*, **55**, 1990, 644.
- [4] Baryko-Pikielna N.: Zarys analizy sensorycznej żywności. WNT, Warszawa 1975, 296, 349.
- [5] Baryko-Pikielna N.: Nowe i znowelizowane metody analizy sensorycznej stosowane w pracach badawczych nad żywnością. W: Postęp w analizie żywności. Tom 2. Wybrane zagadnienia z analizy sensorycznej i fizykochemicznej. Red. St. Tyszkiewicz. PWN Warszawa 1990, 1.
- [6] Blum J.C., Tourraile C., Salichon M.R., Richard F.H., Frigg M.: Effect of dietary vitamin E supplies in broilers. 2. Male and female growth rate, viability, immune response, fat content and meat flavour variations during storage. *Archiv. Für Geflügelkunde*, **56**, 1992, 37.
- [7] Cherian G., Wolfe F.W., Sim J.S.: Dietary oils added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acid, and oxidative stability. *Poultry Sci.*, **75**, 1996, 423.
- [8] Drozdowski B.: Lipidy. W: Chemia żywności. Red. Z. Sikorski. PWN Warszawa 1988, 156.
- [9] Folch J., Lees M., Stanley G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 1957, 497.
- [10] Gray J.I., Pearson A.M.: Rancidity and warmed-over flavor. *Adv. Meat Research*, **3**, 1987, 221.
- [11] Hrdinka C., Zollitsch W., Knaus W., Lettner F.: Effect of dietary fatty acid pattern on melting point and composition of adipose tissues and intramuscular fat of broiler carcasses. *Poultry Sci.*, **75**, 1996, 208.
- [12] Hulan H.W., Proudfoot F.G., Nash D.M.: The effects of different dietary fat sources on general performance and carcass fatty acid composition of broiler chickens. *Poultry Sci.*, **63**, 1984, 324.
- [13] Jensen C., Engberg R., Jakobsen K., Skibsted L.H., Bertelsen G.: Influence of the oxidative quality of dietary oil on broiler meat storage stability. *Meat Sci.*, **47**, 1997, 211.
- [14] Lillard D.A.: Oxidative deterioration in meat, poultry, and fish. W: Warmed-over flavor of meat. Ed. A.J. Angelo, M.E. Bailey, Academic Press, INC. 1987, 41.
- [15] Lin C.F., Gray J.I., Asghar A., Buckley D.J., Booren A.M., Flegal C.J.: Effects of dietary oils and α -tocopherol supplementation on lipid composition and stability of broiler meat. *J. Food Sci.*, **54**, 1989, 1457.
- [16] Lopez-Ferrer S., Baucells M.D., Barroeta A.C., Blanch A., Grashorn M.A.: ω -3 enrichment of chicken meat: use of fish, rapeseed and linseed oils. *Proceed. of the 13th European Symposium on the quality of Poultry Meat. Poznań 1997*, 74.
- [17] Malczyk E. i Smolińska T.: Wpływ rodzaju obróbki cieplnej i czasu przechowywania na jakość peklowanego i nie peklowanego mięsa kurcząt. *Zeszyty Nauk. Akademii Rolniczej, Wrocław 1999* (w druku).
- [18] Mercier Y., Gatellier P., Viau M., Remignon H., Renerre M.: Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci.*, **48**, 1998, 301.

- [19] Pikul J.: Powstawanie obcego, niepożądanego zapachu i smaku w mięsie ogrzanym i przechowywanym w warunkach chłodniczych. PTTŻ, Poznań 1991, 17.
- [20] Pikul, J., Leszczyński, D.E., and Kummerow, F.A.: The elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1983, 1338.
- [21] Pikul J., Hołownia K., Plewiński A.: Influence of dietary alpha-tocopherol acetate on lipid oxidation in chicken meat. *Proceed. of the 13th European Symposium on the Quality of Poultry Meat. Poznań 1997*, 21.
- [22] PN-73/A-82111, Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości tłuszczu.
- [23] Rhee K.S., Anderson L.M., Sams A.R.: Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. *J. Food Sci.*, **61**, 1996, 8.
- [24] Sheehy P.J.A., Morrissey P.A., Flynn A.: Effect of dietary α -tocopherol level on susceptibility of chicken tissues to lipid peroxidation. *Proceed. of the Nutrition Society*, **49**, 1990, 28A.
- [25] Sheehy P.J.A., Morrissey P.A., Buckley D.J., Frigg M.: Modification of α -tocopherol concentration, fatty acid composition and oxidative stability of chick tissues by consumption of fresh or heated sunflower and linseed oils. *Proceed. of 11th European Symposium on the Quality of Poultry Meat. Tours 1993*, 448.
- [26] 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. of the 12th European Symposium on the Quality of Poultry Meat. Zaragoza 1995*, 425.
- [27] Sheldon B.W.: Effect of dietary tocopherol on the oxidative stability of turkey meat. *Poultry Sci.*, **63**, 1984, 673.
- [28] Sheldon B.W., Curtis P., Dawson P.L., Ferket P.R.: Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability, flavor, color, and volatile profiles of refrigerated and frozen turkey breast meat. *Poultry Sci.*, **76**, 1997, 634.
- [29] Smolińska T., Popiel A.K., Malczyk E.: Influence of dietary supplement with PUFA and antioxidant on oxidative processes of fats and sensorical changes of broiler chicken meat. *Proceed. 10th European Poultry Conference of WPSA. Jerozolima 1998*, 110.
- [30] Younathan M.T., Watts B.M.: Oxidative of tissue lipids in cooked pork. *Food Res.*, **25**, 1960, 538.
- [31] Zaspel B.J., Csallany A.S.: Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography. *Analyt. Biochem.*, **130**, 1983, 146.

INFLUENCE OF FEEDING SYSTEM ON OXIDATIVE PROCESSES OCCURRING IN CHICKEN MEAT DURING REFRIGERATION STORAGE

S u m m a r y

In this study the influence of the dietary supplement with rape, linseed and soya oils with or without antioxidant (vitamin E) on lipid oxidation and flavour of chicken meat was analysed. The results showed that TBA value increased by three times during storage. Vitamin E supplement effectively inhibited undesirable oxidative processes in broiler muscles. Rape and linseed oils supplement led to increase in PUFA n-3 in lipids obtained from breast muscle. Major source of PUFA n-6 was supplement by soya oil. The consumer acceptability was the highest for meat samples of chickens fed with soya oil and vitamin E addition. Deterioration of flavour and odour of meat samples appeared after 4 days of storage. Flavours and odours like rancid, fish, add and metallic were identified. ☒

MACIEJ OZIEMBŁOWSKI

PARAMETRY ANALIZY TERMOMECHANICZNEJ NA PRZYKŁADZIE BADAŃ MASY JAJOWEJ

S t r e s z c z e n i e

Scharakteryzowano technikę analizy termomechanicznej TMA na przykładzie masy jajowej. Przedstawiono miejsce analizy TMA na tle reologii produktów spożywczych jako jedną z metod dynamicznego testowania ciał o cechach lepkosprężystych. Określono parametry reologiczne możliwe do wyznaczenia dzięki TMA oraz scharakteryzowano ich wartości w odniesieniu do masy jajowej.

Wstęp

Reologia jako dyscyplina naukowa – będąca na pograniczu fizyki i techniki – znajduje swoje praktyczne zastosowanie m.in. w technologii żywności. Reologia zajmuje się wszystkimi aspektami odkształcania ciał rzeczywistych pod wpływem zewnętrznych naprężeń [2]. Właściwości reologiczne są jednymi z ważniejszych kryteriów opisujących badane próby. W zależności od rodzaju żywności analizowane parametry reologiczne dotyczą ciał płynnych, stałych lub ciał o cechach pośrednich (pomiędzy płynem a ciałem stałym). Prosta klasyfikacja reologiczna [11], przedstawiona na rys. 1, pokazuje najczęściej spotykaną terminologię, która ma zastosowanie m.in. do produktów żywnościowych.

Masa jajowa w zależności od czasu i temperatury przechowywania, obróbki termicznej, dodatków i wielu innych czynników może być opisywana różnymi równaniami reologicznymi charakterystycznymi dla płynu niutonskiego, tiksotropowego czy Bingham'a [4]. Do badań niektórych parametrów reologicznych masy jajowej można stosować analizę termomechaniczną TMA, która jest techniką służącą do pomiarów relacji zachodzących w badanej próbce pomiędzy temperaturą, naprężeniem i odkształceniem. W technice tej stosowane mogą być różne wartości temperatury oraz naprężenia – w postaci zadanego „obciążenia” (g) siłą zewnętrzną w stosunku do ana-

lizowanej próby lub zadanego „przesunięcia” (μm) czynnika zewnętrznego (np. trzęsienia) na określoną głębokość w próbce.

Analiza termomechaniczna umożliwia stosowanie naprężeń według zadanego programu w sposób liniowy albo oscylacyjny. W przypadku wykorzystania naprężeń oscylacyjnych [7] analizę tego typu nazywa się również dynamiczną analizą termomechaniczną (DTMA) [12]. W niniejszej pracy przedstawiono podstawowe założenia analizy termomechanicznej pokazane na przykładzie badań masy jajowej.

Materiał i metody badań

Wykorzystany w badaniach zestaw do analizy termomechanicznej składał się z modułu pomiarowego (TMA/SS 150U firmy Seiko), modułu komputerowego HP712/60 (odpowiedzialnego za nadzorowanie przebiegu pomiarów i analizę wyników) oraz drukarki.

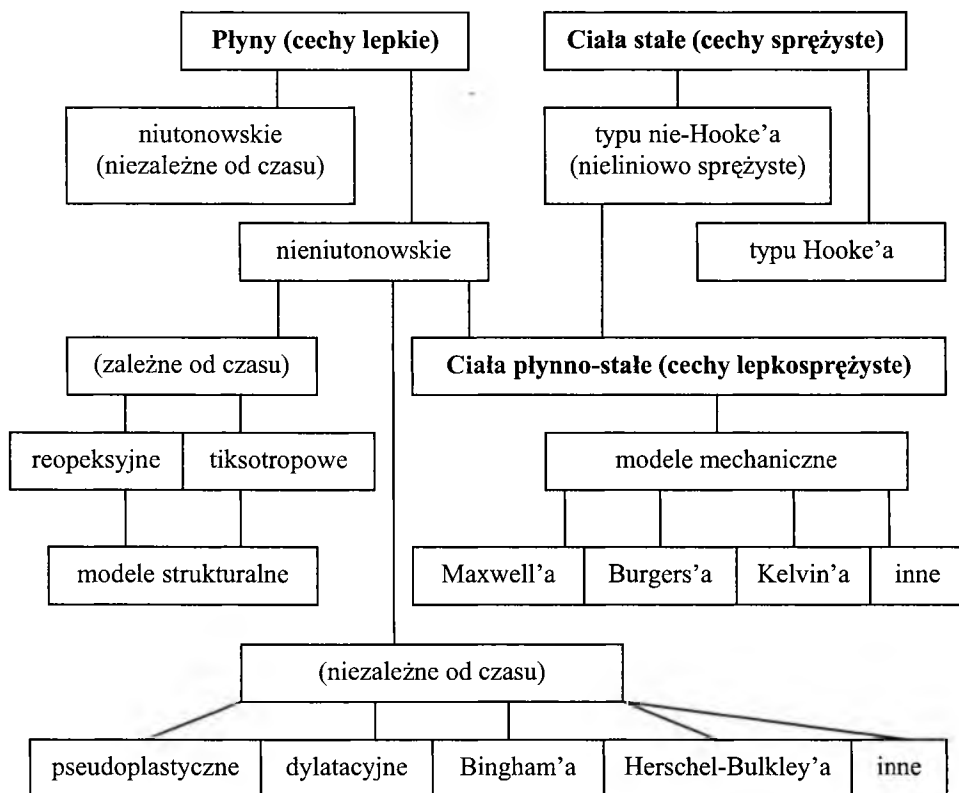
W eksperymencie wykorzystano masę jajową uzyskaną poprzez homogenizację treści jaj w stosunku masowym białko-żółtko 2:1. Jaja pochodziły od niosek rasy Hy-Line (52 tygodniowych) z fermy Wojnowice. Badaną masę jajową o objętości 1 cm^3 umieszczono w małym kwarcowym pojemniku, a całość zamknięto w komorze ogrzewania gdzie realizowane były określone programy – „termiczny” oraz „mechaniczny”. Podczas analizy umieszczony w próbce kwarcowy trzpień poruszał się według zadanego programu „mechanicznego” (realizującego naprężenie o amplitudzie 0,2 g i częstotliwości 0,1 Hz) w ustalonym (w programie „termicznym”) zakresie temperatur 35–95°C przy zadanej szybkości ogrzewania 3°C/min. Podczas analizy bieżące wyniki rejestrowane i zapisywane były automatycznie co 0,1 s.

Omówienie wyników

Testowanie dynamiczne, którego jednym z przykładów jest analiza termomechaniczna zastosowana w niniejszym eksperymencie, jest jedną z metod służących do analizowania właściwości lepkosprężystych różnych składników żywności. Metoda ta może być wykorzystywana m.in. do określania siły żeli, badań procesu żelowania, obserwacji koagulacji i denaturacji białka, określania procesów krzepnięcia i topnienia produktów żywnościowych, badań określających korelację pomiędzy parametrami reologicznymi a zmysłami człowieka, określania stabilności produktów spożywczych podczas ich przechowywania i in. [11].

Istotą badań reologicznych przy zastosowaniu dynamicznego testowania jest przyłożenie sinusoidalnie zmieniającej się siły (naprężenia) w badanym ośrodku i rejestrowanie jego stopnia odkształcenia (będącego „odpowiedzią” na zadaną siłę). W przypadku analizy termomechanicznej możliwe jest przedstawienie na wykresie zastosowanego naprężenia oraz otrzymanego odkształcenia nie tylko w funkcji czasu ale

również w funkcji temperatury. Wykres tego typu otrzymany w bieżącym eksperymencie (rys. 2), przedstawia naprężenie o jednakowej amplitudzie ($A = 0,2$ g) i okresie ($T = 10$ s) w całym analizowanym zakresie temperatury oraz odkształcenie jako sygnał TMA (mm) z wyraźnym zmniejszeniem się amplitudy po osiągnięciu temperatury $82,8^{\circ}\text{C}$, w której nastąpiło przejście fazowe żol-żel w ujęciu mechanicznym.

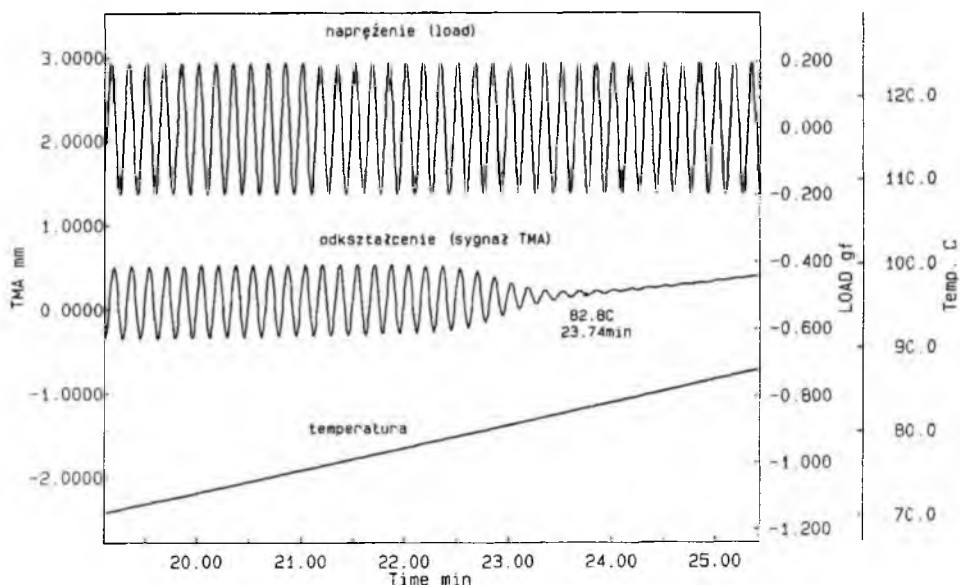


Rys. 1. Prosta klasyfikacja reologiczna.

Fig. 1. Simple classification of rheological behavior.

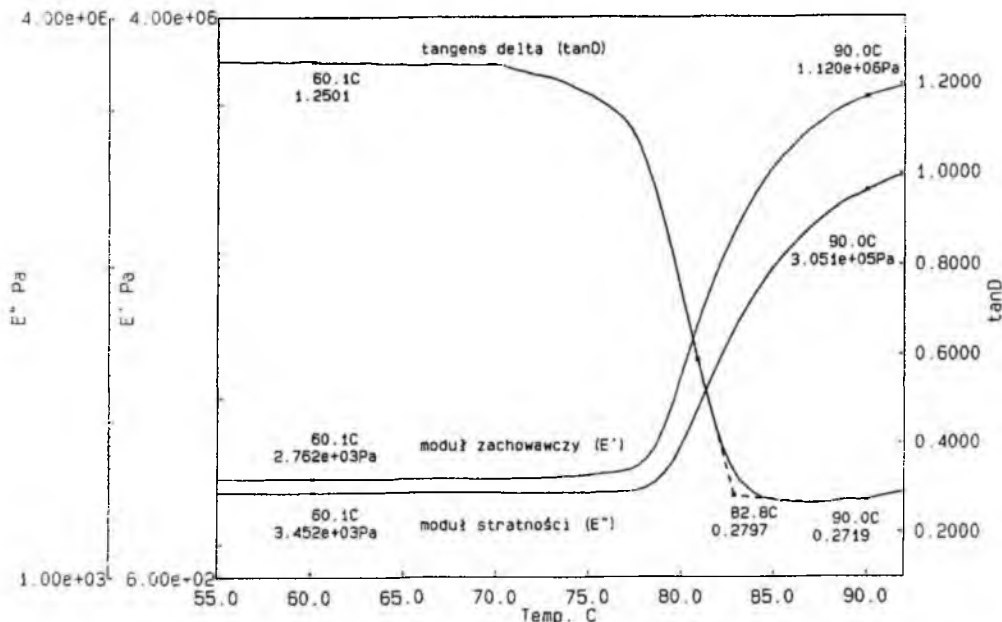
Po przeprowadzeniu pomiarów możliwa była analiza reologiczna masy jajowej pod kątem jej cech lepkosprężystych, które można wyrazić za pomocą *modułu zachowawczego* E' (będącego miarą sprężystości /elastyczności/ lub inaczej – energii nagromadzonej, zakumulowanej w materiale) oraz *modułu stratności* E'' (miara lepkości albo rozproszenia /ubytku/ energii przez dany materiał podczas odkształcenia). Inną wartością często wykorzystywaną przy opisywaniu cech lepkosprężystych jest *tangens delta* ($\text{tg } \delta = E''/E'$), który przyjmuje wysokie wartości dla rozcieńczonych roztworów

($\delta = 90^\circ$ dla ciała idealnie lepkiego), zaś dla polimerów i żeli wartość jego dąży do zera ($\delta = 0^\circ$ dla ciała idealnie sprężystego) [3, 5, 12].



Rys. 2. „Odpowiedź” masy jajowej (odkształcenie) na zadane naprężenie w funkcji czasu i temperatury.
Fig. 2. „Response” of liquid whole egg (strain) on stress in function of time and temperature.

Na rys. 3 przedstawiono wszystkie trzy parametry (E' , E'' oraz $\tan \delta$) opisujące właściwości reologiczne masy jajowej w funkcji temperatury. Wartości modułu zachowawczego E' oraz modułu stratności E'' były praktycznie na stałym poziomie (tj. odpowiednio 2,762 kPa oraz 3,452 kPa), aż do osiągnięcia temperatury, w której rozpoczęły się zmiany strukturalne (tj. ok. 78–79°C). Wyraźny przyrost wartości E' rozpoczął się nieco szybciej (przy temperaturze ok. 78°C) aniżeli przyrost E'' (ok. 79°C). Również wartości modułów E' i E'' osiągnięte po przejściu fazowym zol-żel, a wyznaczone przy $T = 90^\circ\text{C}$, wskazują na znacznie wyższą wartość modułu zachowawczego (1,120 MPa) w porównaniu do modułu stratności (0,305 MPa). Skutkiem tego tangens delta, który przed zmianami denaturacyjnymi masy jajowej wynosił ok. 1,25 po tychże zmianach przybrał wartość ok. 0,27 (przy $T = 90^\circ\text{C}$). Ekstrapolowana wartość $\tan \delta$ pozwoliła na określenie końcowej temperatury przejścia fazowego jako 82,8°C.



Rys. 3. Moduł zachowawczy E' , moduł stratności E'' oraz tangens delta masy jajowej w funkcji temperatury.

Fig. 3. Storage modulus E' , loss modulus E'' and tangens delta of liquid whole egg in function of temperature.

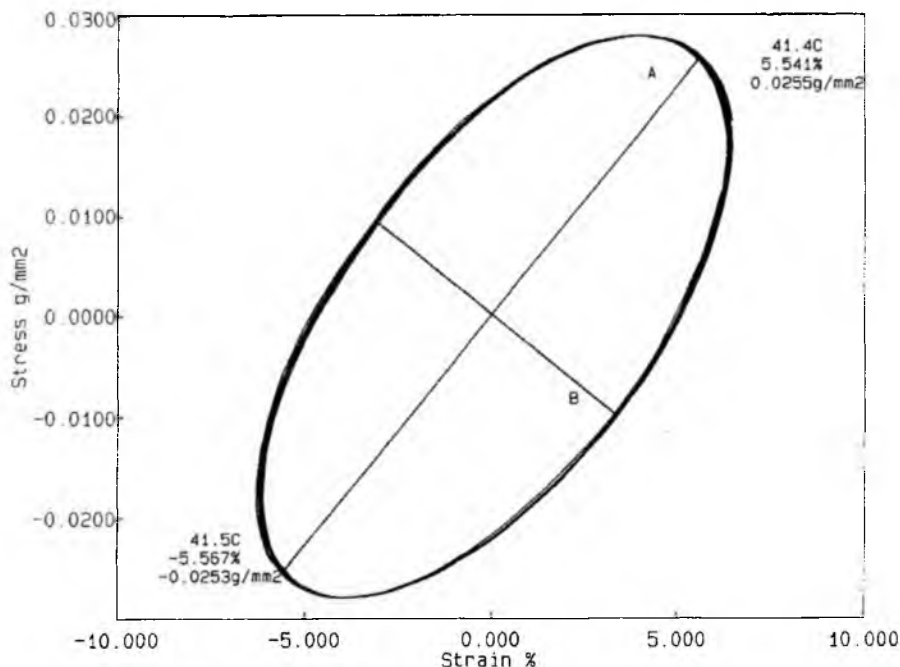
Należy zwrócić uwagę, że mówiąc o przejściu fazowym w aspekcie mechanicznym (podczas analizowania wyników uzyskanych dzięki TMA) rozumie się przejście związane z budową trójwymiarowej siatki dzięki denaturacji (w temperaturze ponad 80°C) określonych białek obecnych w masie jajowej [1]. Początek przejścia fazowego dotyczącego białek masy jajowej wyznaczony inną techniką, np. różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) może znacznie różnić się [8, 9] od początkowej temperatury przejścia wyznaczonego przy użyciu TMA. Tak, jak DSC pokazuje przemiany w ujęciu termicznym, związane z wydzielaniem bądź pochłanianiem energii cieplnej, tak TMA wskazuje na zmiany ściśle związane ze strukturą badanego materiału – a więc np. tworzeniem się żeli, topnieniem, rozluźnieniem struktury itp.

Innym sposobem prezentacji uzyskanych wyników za pomocą TMA jest wykres ukazujący zależność „naprężenie [g/mm^2] – odkształcenie [%]” obrazujący charakter cech lepkosprężystych badanej próby w określonych zakresach temperatury. W przypadku ciał idealnie lepkich na wykresie tego typu znajduje się okrąg, zaś ciała idealnie sprężyste reprezentowane są na wykresie przez odcinek. W przypadku masy jajowej ogrzewanej w zakresie temperatur $40\text{--}45^{\circ}\text{C}$ na wykresie „naprężenie-odkształcenie”

widoczna jest elipsa (rys. 4) charakterystyczna dla płynów rzeczywistych wykazujących zarówno cechy lepkie, jak i sprężyste. W takim przypadku (odnoszącym się do ciał lepkosprężystych) w danej elipsie stosunek osi długiej (A) do osi krótkiej (B) można przedstawić według zależności:

$$A/B = 1 : \operatorname{tg}(\delta/2)$$

gdzie: δ – przesunięcie fazowe pomiędzy naprężeniem a odkształceniem.

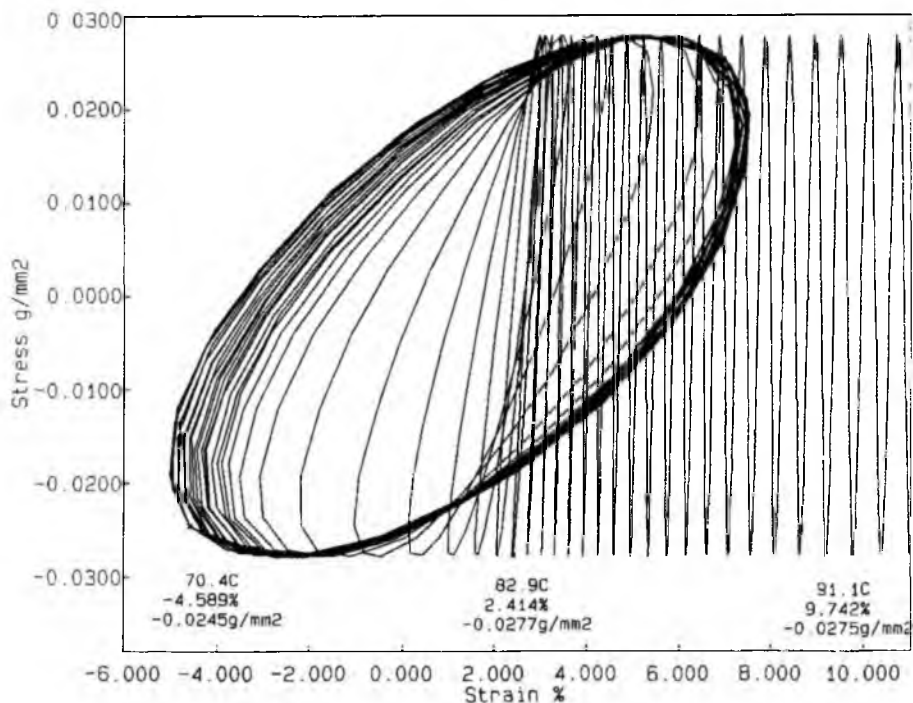


Rys. 4. Wykres typu „naprężenie-odkształcenie” dla masy jajowej w zakresie temperatur 40–45°C.

Fig. 4. „Stress-strain” graph for liquid whole egg in temperature range 40–45°C.

Tangens delta, który jak wspomniano wyraża stosunek E'' do E' , można obliczyć również na podstawie wykresu naprężenie-odkształcenie z poniższej zależności:

$$\operatorname{tg}\delta = \frac{2 \cdot \operatorname{tg} \frac{\delta}{2}}{1 - \operatorname{tg}^2 \frac{\delta}{2}} = \frac{2 \cdot \frac{B}{A}}{1 - \left(\frac{B}{A}\right)^2}$$

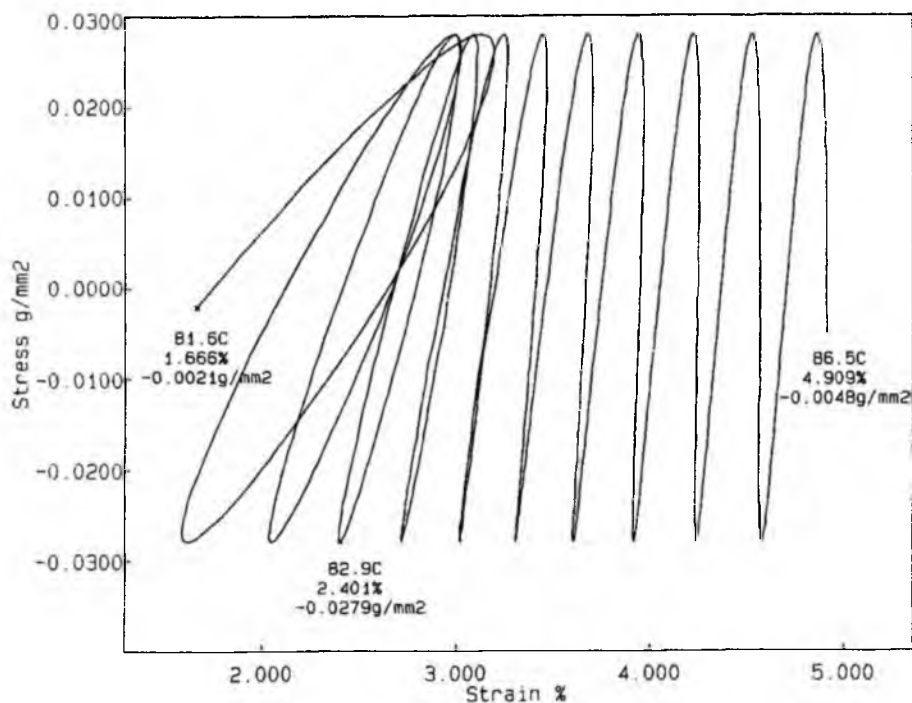


Rys. 5. Wykres typu „naprężenie-odkształcenie” dla masy jajowej w zakresie temperatur 70–93°C.

Fig. 5. „Stress-strain” graph for liquid whole egg in temperature range 70–93°C.

W przypadku masy jajowej po zmianach denaturacyjnych charakter krzywej (na wykresie naprężenie-odkształcenie) jest zupełnie inny. Na rys. 5 przedstawiającym wykres tego typu dla masy jajowej (w zakresie temperatur 70–93°C) wyraźnie widać część krzywej przypominającej elipsę, która odnosi się do surowca przed przejściem fazowym oraz część krzywej o charakterze oscylacyjnym odnosząca się do masy jajowej po utworzeniu żelu. W celu lepszego przedstawienia przejścia fazowego zol-żel na rysunku 6 zawężono zakres temperatur do przedziału 81,6–86,5°C.

Należy stwierdzić na podstawie innych doświadczeń [6, 9, 10], że wartości parametrów reologicznych w odniesieniu do masy jajowej różnią się w zależności od sposobu obróbki termicznej, szybkości ogrzewania, dodatków i innych czynników, ale najczęściej spotykane wartości wynoszą – dla próby ogrzanej do 40°C: $E' = \text{ok. } 10^3\text{--}10^4 \text{ Pa}$, $E'' = \text{ok. } 10^3\text{--}10^4 \text{ Pa}$, $\text{tg } \delta = \text{ok. } 0,5\text{--}1,2$, zaś w przypadku prób dogrzanych do 90°C: $E' > 10^6 \text{ Pa}$, $E'' = \text{ok. } 10^5\text{--}10^6$, $\text{tg } \delta = \text{ok. } 0,2\text{--}0,3$.



Rys. 6. Wykres typu „naprężenie-odkształcenie” dla masy jajowej w zakresie temperatur 81,6–86,5°C.

Fig. 6. „Stress-strain” graph for liquid whole egg in temperature range 81,6–86,5°C.

Podsumowanie

Podsumowując charakterystykę analizy TMA można stwierdzić, że metoda charakteryzuje się dużą dokładnością i powtarzalnością wyników. Rozmiar analizowanych próbek jest niewielki, gdyż wymagana objętość próbki płynnej to 1 cm³, zaś dla próbki stałej wymagany jest walec o średnicy ok. 10 mm i wysokości ok. 25 mm. Pomimo małych rozmiarów próbki analiza TMA charakteryzuje się szerokim zakresem pomiaru, tj. ± 5 mm przy tzw. „szumie” nie większym niż 0,01 μ m. Automatyczny pomiar i bieżący zapis analizowanych parametrów podczas trwania analizy oraz system zabezpieczeń przed niepożądanym, znacznym zwiększeniem objętości analizowanej próbki znacznie upraszcza obsługę urządzenia. Analizę TMA określić można jako jedną z przydatnych metod umożliwiających szybką i dokładną charakterystykę reologiczną (również w funkcji temperatury) masy jajowej oraz innych produktów żywnościowych.

LITERATURA

- [1] Barbut S., Findlay C.J.: Thermal analysis of egg proteins. Thermal analysis of foods. V.R. Harwalkar and C.-Y. Ma ed., Elsevier Applied Science, 1990, 126-148.
- [2] Drabent R.: Podstawy reologii. Wydawnictwo ART, Olsztyn 1994.
- [3] Hamann D.D., Purkayastha S., Lanier T.C.: Applications of thermal scanning rheology to the study of food gels. V.R. Harwalkar and C.-Y. Ma ed., Elsevier Applied Science, 1990, 306-332.
- [4] Herald T.J., Osorio F.A., Smith D.M.: Rheological properties of pasteurized liquid whole egg during frozen storage. *J. Food Sci.*, **54**, 1989, 35-38.
- [5] Hsieh Y.L., Regenstein J.M., Rao M.A.: Gel point of whey and egg proteins using dynamic rheological data. *J. Food Sci.*, **58**, 1993, 116-118.
- [6] Lorient D.: Functional properties of egg constituents. Proceed. of the 7th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products. Poznań 1997, 218-223.
- [7] Meste M., Huang V.: Thermomechanical properties of frozen sucrose solutions. *J. Food Sci.*, **57**, 1992, 1230-1233.
- [8] Nicpoń A.: Oznaczanie właściwości termicznych masy jajowej w wykorzystaniem techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC. Nowoczesne metody eksperymentalne w badaniach żywności. Materiały IV Sesji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ. Rynia 1999, 53-54.
- [9] Nicpoń A., Oziębłowski M., Trziszka T.: Zmiany zachodzące w treści jaj poddanych procesowi ultrapasteryzacji. Postępy w technologii i chemii żywności. Materiały XXVIII Sesji Naukowej KTiChŻ, Gdańsk 1997, 134.
- [10] Oziębłowski M., Trziszka T., Nicpoń A.: Thermal and thermomechanical characteristics of ultra-pasteurized liquid whole eggs. The poultry industry towards the 21st century. Proceed. of 10th European Poultry Conference, Jerusalem 1998, Abstracts Book, 113.
- [11] Steffe J.F.: Rheological methods in food process engineering. Freeman Press, East Lansing 1992.
- [12] Wetton R.E.: Thermomechanical methods. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol. 1: Principles and Practice. M.E. Brown, ed., Elsevier, 1998, 363-399.

PARAMETERS OF THERMOMECHANICAL ANALYSIS OF LIQUID WHOLE EGG

S u m m a r y

Thermomechanical analysis (TMA) of liquid whole egg was described in the paper. TMA was characterized as one of the dynamic testing method of viscoelastic samples. Rheological parameters obtained from TMA analysis and their values for liquid whole egg were also described. ❖

MACIEJ WOJTCZAK, BOGUSŁAW KRÓL

ZMIENNOŚĆ ZAWARTOŚCI WYBRANYCH ZANIECZYSZCZEŃ CUKRU BIAŁEGO W CZASIE TRWANIA KAMPANII 1998/99

Streszczenie

Badaniami objęto dekadowe próbki cukru białego z dwóch polskich cukrowni z całego czasu trwania kampanii. Badane próbki cukru poddano punktowej ocenie jakości wg wymagań Unii Europejskiej oraz oznaczono zabarwienie sączków z osadem nierozpuszczalnym w wodzie. Zawartość zanieczyszczeń technicznych w postaci jonów Ca, K, Na, Fe, Cu, Zn, Pb, Cd oznaczono metodą spektrometrii absorpcji atomowej, z wykorzystaniem techniki SPE do przygotowania próbek cukru do analizy, wyróżniając frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną w wodzie. Analizowane próbki cukru białego należały do 2 i 3 kategorii i charakteryzowały się niską zawartością pierwiastków toksycznych. Stwierdzono, iż zawartość makropierwiastków w cukrze białym, a zwłaszcza ich dystrybucja między roztworem a osadem, wykazuje istotne zmiany w trakcie trwania kampanii.

Wstęp

Krystaliczny cukier biały jest substancją o wysokiej czystości – zawiera bowiem minimum 99,7% sacharozy [11]. Nie jest on jednak pozbawiony zanieczyszczeń, których zawartość decyduje o jego jakości, a zatem warunkuje konkurencyjność cukru na rynku. Zanieczyszczenia techniczne cukru białego są to substancje obce, które przedostały się do produktu końcowego z surowca (buraka cukrowego) oraz procesu technologicznego. Są one w znacznym stopniu skutkiem niecałkowitego oddzielenia kryształów od roztworu macierzystego oraz defektów procesu krystalizacji (inkluzji i okluzji). Na zanieczyszczenia techniczne cukru mogą składać się wszystkie składniki roztworu macierzystego zarówno nisko i wysokocząsteczkowe związki organiczne jak i związki nieorganiczne [2]. Zawartość oraz rodzaj tych zanieczyszczeń decydują o jakości cukru białego i stąd rutynowym kryterium oceny jakości cukru jest zawartość popiołu oraz zabarwienie [2, 6, 11].

Wzrastająca silnie konkurencyjność na rynku cukru podnosi wciąż wymagania jakościowe stawiane przed cukrem, zwłaszcza przez odbiorców przemysłowych, dla

których istotne stają się nawet drobne różnice jakościowe. Sytuacja ta sprawia, iż rutynowe badania zawartości popiołu konduktometrycznego oraz zabarwienia kryształów i roztworu cukru, stanowiące podstawowe kryterium jakościowe, stają się niewystarczające dla pełnej oceny przydatności i atrakcyjności rynkowej cukru. Coraz większego znaczenia nabiera bezpieczeństwo zdrowotne cukru wyrażone zawartością substancji szkodliwych i obcych (metale ciężkie, akryloamid) [12]. Szczególne znaczenie ma również wysoka czystość mikrobiologiczna cukru [2].

W cukrze białym związki mineralne występują w śladowych ilościach, dlatego wykrycie i oznaczenie ich wymaga czułych metod analitycznych oraz zwykle zateżania analitu. Wciąż wzrastające zainteresowanie zawartością makro- i mikroelementów w cukrze oraz ich śladowa zawartość skłania wielu autorów do stosowania nowych metod analitycznych. Najczęściej obecnie stosowanymi metodami do oznaczania zawartości pierwiastków śladowych w cukrze i produktach cukrowniczych są: ICP-AES [1, 3, 9], DC-PAES [12] oraz AAS [4-8, 10].

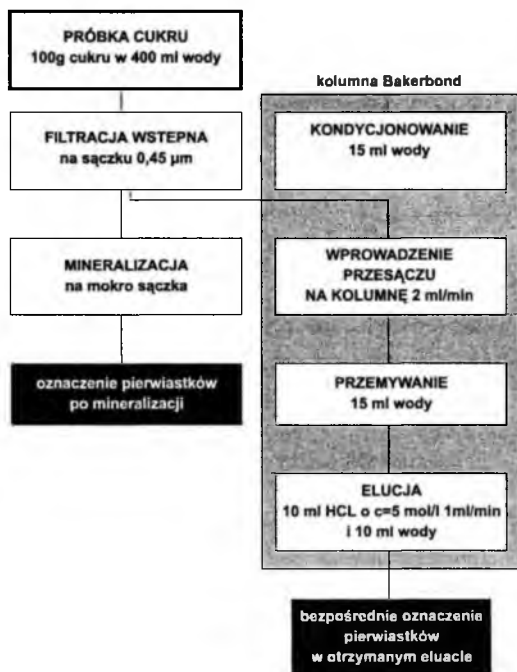
Dotychczas badania zawartości pierwiastków toksycznych i szkodliwych w cukrze wskazują na niskie ich poziomy, a co za tym idzie wysokie bezpieczeństwo zdrowotne cukru, to jednak można zauważyć istotne zróżnicowanie poziomu zanieczyszczeń w zależności od pochodzenia cukru [1, 4-7].

Badania fińskie [3] wykazały brak zależności między zawartością metali ciężkich w burakach i cukrze, co może wskazywać na przeważający wpływ procesu technologicznego na zawartość zanieczyszczeń technicznych w cukrze. Potwierdzają to również wcześniejsze badania autorów na zawartość ołowiu w cukrze i wysłódkach [7], które wykazały, iż proces technologiczny w istotnym stopniu eliminuje możliwość zanieczyszczenia cukru białego ołowiem pochodzącym z buraków. Stąd też istotnym wydaje się zwrócenie uwagi na zmienność zawartości zanieczyszczeń mineralnych w cukrze białym w toku procesu technologicznego.

Celem pracy było określenie zmian zawartości zanieczyszczeń technicznych cukru białego w czasie trwania kampanii 98/99 tj. w okresie od 1.10 do 20.12.1999 r.

Materiały i metody badań

Materiał do badań stanowiło 8 dekadowych prób cukru białego z cukrowni A i 6 z cukrowni B z kampanii 1998/99. Badane próbki poddano punktowej ocenie jakości wg wymagań Unii Europejskiej [11, 14], oznaczając zabarwienie w roztworze, zabarwienie kryształów i zawartość popiołu konduktometrycznego. Dodatkowo wykonano oznaczenie zabarwienia sączka z osadem pozostałym na sączku o średnicy porów 0,45 μm po filtracji roztworu cukru (62,5 g/100 ml). Oznaczenie wykonano mierząc intensywność barwy ze skanowanych obrazów sączków.



Rys. 1. Przygotowanie próbek cukru do analizy zawartości metali ciężkich metodą ASA przez zateżanie techniką SPE..

Fig. 1. Sugar samples preparation by means of SPE concentration technique for determining heavy metals content within AAS method.

Zawartość zanieczyszczeń mineralnych w postaci jonów Ca, K, Na, Fe, Cu, Zn, Pb, Cd oznaczono oddzielnie w przesączonych roztworach cukru (100 g/400 ml) oraz w osadach zatrzymanych na sączkach 0,45 mm. Analizę wykonano metodą spektrometrii absorpcji atomowej przy użyciu aparatu SOLAAR 969 firmy Unicam. Schemat postępowania analitycznego przedstawiono na rys. 1. Jony metali występujące w roztworze cukru zateżono na kolumnach jonowymiennych z kationitem sulfonowym Lewatit UCR-40 wykorzystując jako eluent 5 mol/l kwas solny. Jony metali występujące w osadzie na sączku poddano mineralizacji „na mokro” z użyciem 65% kwasu azotowego [7].

Wyniki

Ocenę punktową analizowanych próbek cukru wg wymagań UE przedstawiono w tabeli 1. Analizowane próbki cukru pochodzące z cukrowni A należały do 2 i 3 kategorii, zaś z cukrowni B do 2. W cukrowni A zaobserwowano znaczący spadek jakości cukru pod koniec kampanii, zaś w cukrowni B najgorsza okazała się dekada IV.

T a b e l a 1

Ocena punktowa cukru białego wg wymagań UE.

Evaluation of white sugar by the European Community quality points.

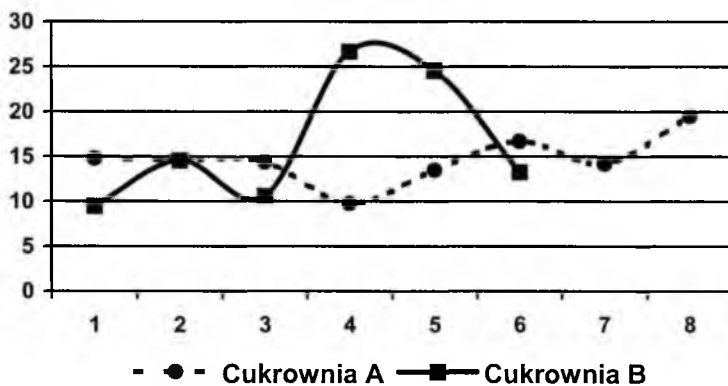
Próbka cukru	Zawartość popiołu	pkt.	Zabarwienie ICUMSA	pkt.	Zabarwienie kryształu	pkt.	Suma	Kat.
Cukrownia A								
A-1	0,020	11,1	42,0	5,6	2,55	5,1	21,8	2
A-2	0,028	15,6	43,9	5,9	2,30	4,6	26,0	3
A-3	0,021	11,7	47,0	6,3	2,61	5,2	23,2	3
A-4	0,023	12,8	42,0	5,6	2,16	4,3	22,7	2
A-5	0,031	17,2	64,0	8,5	3,50	7,0	32,8	3
A-6	0,033	18,3	69,0	9,2	3,34	6,7	34,2	3
A-7	0,028	15,6	63,0	8,4	3,78	7,6	31,5	3
A-8	0,028	15,6	65,0	8,7	3,20	6,4	30,6	3
Cukrownia B								
B-1	0,022	12,2	26,0	3,5	1,68	3,4	19,0	2
B-2	0,020	11,1	29,0	3,9	1,98	4,0	18,9	2
B-3	0,016	8,9	32,0	4,3	1,91	3,8	17,0	2
B-4	0,021	11,7	39,0	5,2	2,25	4,5	21,4	2
B-5	0,020	11,1	33,0	4,4	2,20	4,4	19,9	2
B-6	0,017	9,4	27,0	3,6	1,60	3,2	16,2	2

Zabarwienia sącza z osadem w czasie trwania kampanii przedstawiono na rys. 2. Zabarwienie sączków z osadem próbek cukru z cukrowni A nie wykazuje większych zmian w trakcie trwania kampanii, natomiast w próbkach cukru z cukrowni B występuje dwukrotny przyrost zabarwienia w dekadzie 4 i 5. Ponadto w przypadku próbek z cukrowni B stwierdzono korelacje pomiędzy zabarwieniem osadu a zabarwieniem cukru w roztworze (ICUMSA) ($r = 0,8$) oraz z zawartością wapnia ($r = 0,9$). Korelacja między zabarwieniem sącza, a zawartością wapnia wystąpiła również w próbkach z cukrowni A ($r = 0,9$). W związku z tym zabarwienie sącza może być traktowane jako łatwy i szybki sposób oceny sprawności procesu filtracji oraz jakości cukru.

Zawartość oznaczanych zanieczyszczeń technicznych w analizowanych próbkach cukru białego próbek z cukrowni A przedstawiono w tabeli 2 i cukrowni B w tabeli 3.

Średnie kampanijne zawartości potasu, wapnia, cynku, ołowiu, kadmu w obu cukrowniach są zbliżone i mieszczą się w granicach cytowanych w literaturze [4-6, 8]. Wyraźnie różnią się zawartością sodu, żelaza i miedzi. Na podkreślenie zasługuje miedź, której średnia zawartość w cukrowni B wyniosła 0,17 mg/kg i była znacznie wyższa od średniej z cukrowni A – 0,01 mg/kg, która jest bliższa wartościom podawanym w literaturze (0,02–0,05mg/kg) [4-6, 8]. Duże zróżnicowanie dekadowe zawartości miedzi w cukrowni B sugeruje raczej techniczne źródło tego zanieczyszczenia niż

ekologiczne czy technologiczne. Podobną przypadkowość znajdujemy w zawartości żelaza w obu cukrowniach, którą należałoby wiązać z występowaniem zanieczyszczeń ferromagnetycznych w cukrze pochodzących głównie z korozji aparatury [2].



Rys. 2. Zmienność zabarwienia sączka z osadem w czasie trwania kampanii w cukrowni A i cukrowni B.

Fig. 2. Changes of the colour of the filters with sediment during campaign in A and B sugar-factories.

Tabela 2

Zawartość zanieczyszczeń technicznych w dekadowych próbkach cukru z cukrowni A z kampanii 98/99 w mg/kg.

Content of technical contamination in decade sugar samples in sugar-factory A from the 98/99 campaign in mg/kg.

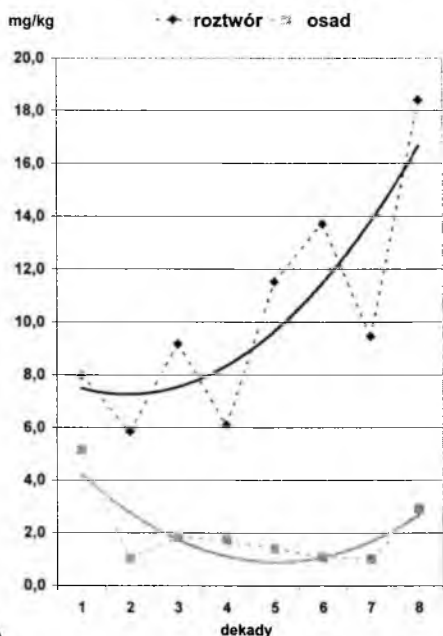
Próbka cukru	K	Na	Ca	Fe	Cu	Zn	Pb	Cd
A-1	23,2	5,6	13,1	2,21	0,02	0,06	0,009	0,001
A-2	31,7	7,2	6,9	0,58	0,01	0,07	0,002	0,001
A-3	31,8	5,8	11,0	1,19	0,01	0,07	0,003	0,001
A-4	27,0	5,3	7,8	0,43	0,02	0,06	0,006	0,001
A-5	38,7	6,4	12,9	0,73	0,01	0,08	0,003	0,001
A-6	41,0	6,9	14,7	0,57	0,01	0,09	0,004	0,001
A-7	35,9	6,1	10,4	0,65	0,01	0,07	0,019	0,001
A-8	30,3	7,2	21,3	0,77	0,00	0,07	0,003	0,001
MIN	23,2	5,3	6,9	0,43	0,00	0,06	0,002	0,001
MAX	41,0	7,2	21,3	2,21	0,02	0,09	0,019	0,001
Średnia	32,4	6,3	12,6	0,98	0,01	0,07	0,007	0,001
SD	5,9	0,7	4,5	0,58	0,01	0,01	0,006	0,000

Tabela 3

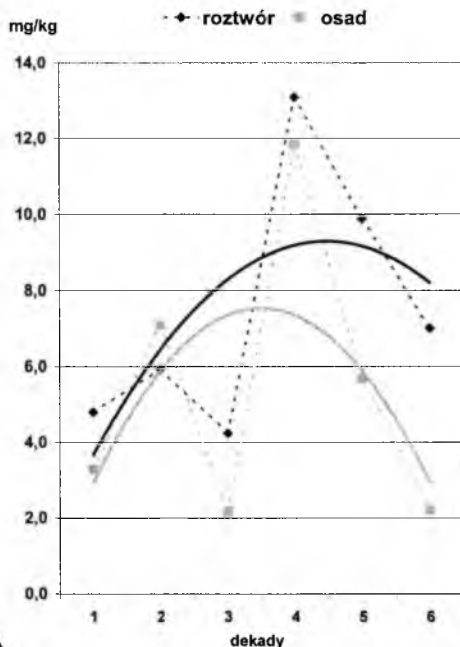
Zawartość zanieczyszczeń technicznych w dekadowych próbkach cukru z cukrowni B z kampanii 98/99 w mg/kg.

Content of technical contamination in decade sugar samples in sugar-factory B from the 98/99 campaign in mg/kg.

Próbka cukru	K	Na	Ca	Fe	Cu	Zn	Pb	Cd
B-1	33,2	5,8	8,1	0,52	0,27	0,07	0,005	0,001
B-2	25,0	3,1	13,0	1,36	0,14	0,06	0,003	0,001
B-3	32,8	4,1	6,4	0,25	0,11	0,05	0,003	0,001
B-4	41,0	3,9	24,9	0,58	0,23	0,02	0,008	0,002
B-5	33,0	3,7	15,5	0,75	0,17	0,04	0,003	0,001
B-6	32,1	4,1	9,3	0,46	0,10	0,06	0,002	0,001
MIN	25,0	3,1	6,4	0,25	0,10	0,02	0,002	0,001
MAX	41,0	5,8	24,9	1,36	0,27	0,07	0,008	0,002
Średnia	32,9	4,2	13,6	0,69	0,17	0,05	0,004	0,001
SD	5,1	0,9	6,8	0,38	0,07	0,02	0,002	0,000



a)



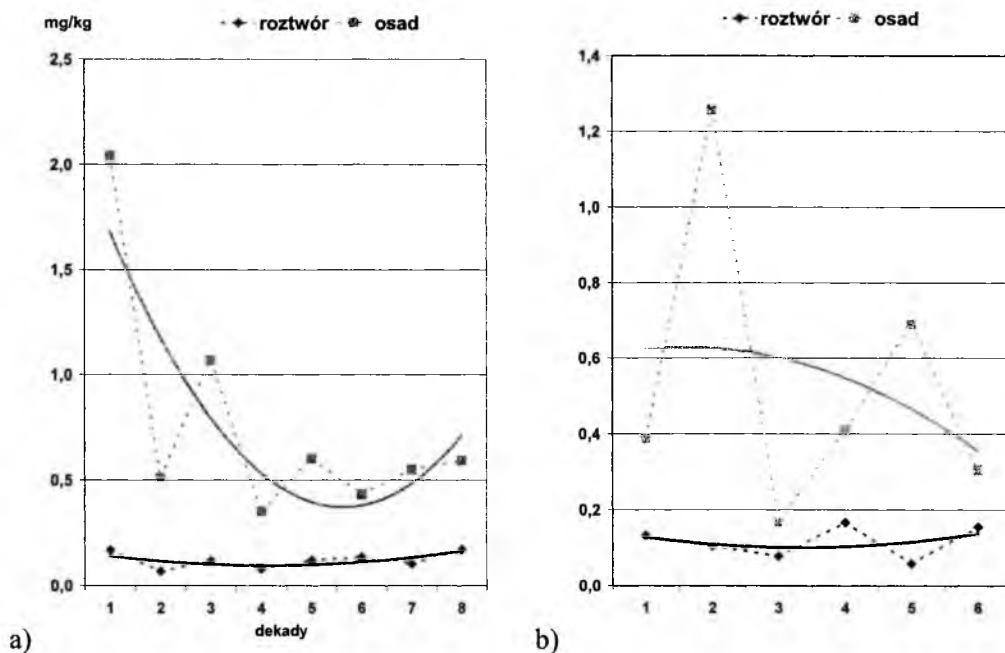
b)

Rys. 3. Zmienność zawartości wapnia w osadzie i cukrze w próbkach cukru z cukrowni A (a) i cukrowni B (b) w trakcie trwania kampanii.

Fig. 3. Changes of calcium content in sediment and sugar solution in sugar samples from sugar-factory A (a) and sugar factory B (b) during the campaign.

Zmienność zawartości wapnia, żelaza i cynku w czasie trwania kampanii oraz dystrybucja między osadem i roztworem przedstawiono na rys. 3–5. Rys. 3a przedstawia wyraźny wzrost zawartości wapnia w roztworze cukru pod koniec kampanii w cukrowni A i względnie stały poziom wapnia w osadzie. Natomiast w cukrowni B, jak przedstawiono na rys. 3b, najwięcej wapnia zarówno w roztworze, jak i osadzie było w dekadzie 4 i 5.

Z rys. 4a wynika, że żelazo w cukrze z cukrowni A występuje głównie w osadzie i jego zawartość spada w czasie trwania kampanii, żelazo w roztworze utrzymuje się na względnie stałym poziomie. W cukrze z cukrowni B również żelazo występuje głównie w osadzie i wykazuje dużą zmienność (przypadkowość).

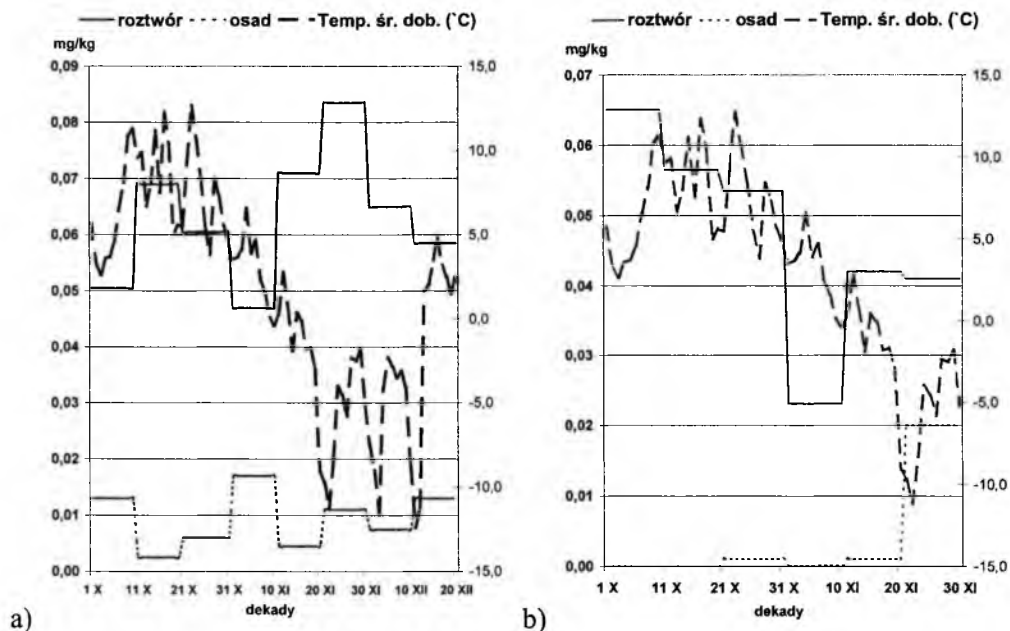


Rys. 4. Zmienność zawartości żelaza w osadzie i cukrze w próbkach cukru z cukrowni A (a) i cukrowni B (b) w trakcie trwania kampanii.

Fig. 4. Changes of iron content in sediment and sugar solution in sugar samples from sugar-factory A (a) and sugar factory B (b) during the campaign.

Na rys. 5a i 5b przedstawiono zmiany zawartości cynku w czasie trwania kampanii z uwzględnieniem przebiegu średniej temperatury dobowej. W obu cukrowniach Zn znajduje się głównie w roztworze. W cukrowni A można wyraźnie zauważyć wzrost zawartości cynku wraz ze spadkiem średniej dobowej temperatury poniżej zera, co można tłumaczyć wpływem niskiej temperatury (przemarzanie buraków) na wzrost

ekstrakcji cynku z buraków do soku i tym samym wzrost jego zawartości w cukrze białym. Podobnej zależności nie zaobserwowano w cukrowni B, w której kampania trwała o dwie dekady krócej (do 30.XI).



Rys. 5. Zmienność zawartości cynku w osadzie i cukrze w próbkach cukru z cukrowni A (a) i cukrowni B (b) w trakcie trwania kampanii z uwzględnieniem przebiegu temperatury.

Fig. 5. Changes of zinc content in sediment and sugar solution in sugar samples from sugar-factory A (a) and sugar factory B (b) during the campaign with temperature dependence.

Wnioski

1. Zawartość ołowiu i kadmu w cukrze białym utrzymywała się na niskim poziomie przez całą kampanię.
2. Zawartość potasu, wapnia i sodu w cukrze białym, a zwłaszcza ich dystrybucja między roztworem a osadem, wykazuje istotne zmiany w trakcie trwania kampanii.
3. Zawartość żelaza w cukrze wykazuje dużą przypadkowość, którą można wiązać z przechodzeniem zanieczyszczeń ferromagnetycznych do odwirowanych kryształów.
4. Zdecydowanie podwyższona zawartość miedzi w cukrze z cukrowni B świadczy o lokalnym źródle tego zanieczyszczenia.
5. Zabarwienie sącza z osadem jest ściśle skorelowane z zawartością wapnia w cukrze i może być traktowane jako ocena sprawności procesu filtracji.

LITERATURA

- [1] Allen L.B., Siitonen P.H., and Thompson H.C.: Methods for the Determination of Arsenic, Cadmium, Copper, Lead, and Tin in Sucrose, Corn Syrups, and High-Fructose Corn Syrups by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 162-165.
- [2] Cukrownictwo, red. R.A. McGinnisa, WNT, Warszawa 1976.
- [3] Erjala M., Erviö R.: Heavy Metal Concentrations in Beet in Finland, *Int. Sugar Jnl.*, **98**, 1996, 62-69
- [4] Inorganic non-sugars, Raporty ICUMSA, 1982, 283-289.
- [5] Inorganic non-sugars, Raporty ICUMSA, 1986, 293-307.
- [6] Król B., Lisik K.: Zanieczyszczenia techniczne produktów cukrowniczych w aspekcie aktualnych regulacji prawnych, *Informator Stowarzyszenia Techników Cukrowników*, **13**, 1994, 1-7.
- [7] Król B., Wojtczak M.: Oznaczanie zawartości ołowiu metodą FAAS w wybranych produktach cukrowniczych, Komitet Naukowy "Człowiek i Środowisko" przy Prezydium PAN, *Zeszyty Naukowe 14 "Ołów w Środowisku - Problemy Ekologiczne i Metodyczne"*, Warszawa 1998.
- [8] Leblebici J., Volkan M.: Sample Preparation for Arsenic, Copper, Iron, and Lead Determination in Sugar, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 173-177.
- [9] Masłowska J., Ahmadi M.: Badanie poziomu składników mineralnych w cukrze białym metodą emisyjnej spektrometrii atomowej (ESA), *Przemysł Spożywczy*, **2**, 199, 43-45.
- [10] Miller-Ihli N.J.: Evaluation of a Graphite Furnace Atomic Absorption Method Developed for the Determination of Lead in Sugars, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 923-927.
- [11] Polska Norma PN-A-74850 1996, "Cukier biały".
- [12] Sai Prakash P.K., Ram Mohan M. and Bapu Rao S.: Trace Metals in Cane Juice and Sugar Factory Products. Analysis by direct current plasma atomic emission spectrometry, *Int. Sugar Jnl.*, **97**, 1995, 362-369.
- [13] Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 31 marca 1993 r. (Dz.U. Nr 85, poz 233).
- [14] Zbiór przepisów ICUMSA, Warszawa 1997 r.

CHANGES OF THE CONTENT OF SELECTED IMPURITIES IN WHITE SUGAR DURING THE 1998/99 CAMPAIGN

S u m m a r y

The investigations were carried out for decade samples of sugar from two Polish sugar-factories during the whole period of the campaign. The investigated sugar samples were evaluated according to the requirements of the European Community quality points and the colour of the filters with sediment insoluble in water was determined. The content of technical contamination in the form of Ca, K, Na, Fe, Cu, Zn, Pb, Cd ions was determined by means of the atomic absorption spectrometry method, while the SPE technology was used to prepare the sugar samples for the analysis, and the fractions soluble and insoluble in water were distinguished. The analysed samples of white sugar belonged to 2 and 3 categories and they were characterised by a low content of toxic elements. It was found out that the content of macroelements in white sugar, particularly their distribution between the solution and the sediment, showed significant changes during the whole campaign period. ☒

IWONA KIHLEBERG

SZWEDZKI INTERDYSCYPLINARNY PROGRAM NAUKOWY „ŻYWNOŚĆ 21”

„Żywność 21” jest szwedzkim interdyscyplinarnym programem naukowym finansowanym przez MISTRE, funkcję utworzoną w celu wspierania strategicznych badań na rzecz ochrony środowiska.

Badania naukowe programu „Żywność 21” mają na celu znalezienie kompleksowych i optymalnych rozwiązań dla szwedzkiego rolnictwa, a w perspektywie wypracowania systemu produkcji funkcjonującego zgodnie z zasadami ekorozwoju. U podstaw programu „Żywności 21” leżą dalekosiężne cele, które wytyczają kierunek zmian w metodach produkcji rolnej. Cele te odzwierciedlają się w deklaracji programowej określającej założenia dotyczące sposobów produkcji i jakości produktu. W programie „Żywność 21” ważny jest również aspekt etyczny, w ramach którego metody produkcji wymagają akceptacji zarówno ze strony rolnika, jak i konsumenta. Ponadto nowoczesne metody produkcji rolnej muszą być opłacalne dla producenta oraz powinny gwarantować wystarczającą ilość i zadawalającą jakość produktów. Chodzi więc o stworzenie takich rozwiązań, które nie obciążają środowiska naturalnego, satysfakcjonują zarówno rolnika, jak i konsumenta.

W ciągu ostatnich 50 lat również rolnictwo szwedzkie cechowała wzrastająca intensywność produkcji roślinnej i zwierzęcej, co doprowadziło do zakłócenia równowagi biologicznej agroekosystemów i pogorszenia sytuacji zwierząt hodowlanych. Choć środowisko naturalne na obszarze Szwecji nie należy do najbardziej skażonych w skali światowej czy europejskiej to problem ten jednak istnieje, a „Żywność 21” ma przyczynić się do wypracowania metod powstrzymujących proces zanieczyszczenia środowiska naturalnego.

Czas trwania programu naukowego „Żywność 21” przewidywany jest na lata 1997–2004. Na pierwszy okres, obejmujący lata 1997–2000 otrzymano sumę 58 milionów koron szwedzkich. Obecnie badania naukowe prowadzone są przez 30 doktorantów, głównie w Akademii Rolniczej w Uppsali, jak również na uniwersytetach w

różnych miastach Szwecji, od najbardziej na południe wysuniętym w Lund, aż do leżącego na północy w Umeå. Około 20 grup naukowych na pięciu uniwersytetach bierze udział w pracach badawczych. Oprócz doktorantów uczestniczy w programie około stu naukowców reprezentujących różne dyscypliny naukowe. W roli ekspertów występują też emerytowani naukowcy.

Prace badawcze prowadzone są w pięciu blokach tematycznych o nazwach: „Uprawa roślin”, „Hodowla zwierząt”, „Jakość produktów żywnościowych”, „Konsument i rolnicy” oraz „Analiza systemów”.

Elektroniczna technika informacyjna odgrywa dużą rolę nie tylko w utrzymywaniu kontaktów między uczestnikami programu „Żywność 21”, ale przede wszystkim w wymianie informacji, dyskusjach i sukcesywnym publikowaniu wyników badań.

Uzyskane rezultaty mają stanowić podstawę do wypracowania optymalnych rozwiązań w zakresie produkcji rolnej w Szwecji przy aktywnym udziale rolnika i konsumenta. Konsument szwedzki przykładą wagę nie tylko do jakości produktu, lecz również zaczyna wykazywać zainteresowanie rodzajem stosowanych metod produkcji, także pod kątem ich wpływu na środowisko naturalne. Ponieważ rosnący popyt na nowe produkty stanowi nieodzowny warunek rozwoju wdrażanego systemu produkcji, ważnym jest, by sposób produkcji żywności stał się argumentem zachęcającym do zakupu dla jak najszersze do grona konsumentów. Dlatego, w programie „Żywność 21”, dyskutuje się zagadnienie wprowadzenia oznakowania żywności produkowanej nowymi metodami. W tym celu nawiązano w marcu 1999 r. współpracę z organem kontrolnym producentów żywności ekologicznej mającym własny znak jakości. Ponadto „Żywność 21” rozpoczęła też prace nad opracowaniem wskaźników określających wpływ metod produkcji konkretnych produktów żywnościowych na środowisko.

W najnowszym projekcie „Food Chain 21” badana jest organizacja przepływu produktów od rolnika do konsumenta pod kątem opłacalności i oddziaływania na środowisko. W ramach tego projektu „Żywność 21” nawiązała współpracę z Instytutem Żywności i Biotechniki w Geteborgu oraz z przedstawicielami transportu i przemysłu spożywczego w celu wypracowania całościowych i optymalnych rozwiązań dotyczących m.in. przewozu artykułów rolno-spożywczych.

W celu współdziałania i możliwie najefektywniejszego zastosowania uzyskanych wyników z przeprowadzonych prac badawczych powołano tzw. grupę referencyjną, składającą się z rolników, przedstawicieli handlu, organizacji konsumenckich, organizacji ochrony środowiska, przemysłu spożywczego i władz administracyjnych. Zadaniem grupy referencyjnej jest oprócz wdrażania osiągniętych wyników badań naukowych, udział w dyskusjach dotyczących spraw naukowych i priorytetu planowanych badań.

Ogniwo pośrednie między doktorantami publikującymi rezultaty przeprowadzonych prac, a grupą referencyjną stanowią naukowcy zajmujący się syntezą wyników

uzyskanych w poszczególnych projektach programu. Zsumowanie wyników z przeprowadzonych projektów daje bowiem większą wiedzę niż oddzielne rozpatrywanie rezultatów z poszczególnych badań. Proces syntezy jest prowadzony na bieżąco, a celem jest uzyskanie całościowych rozwiązań nie kolidujących ze sobą na poszczególnych odcinkach. Stopniowe i sukcesywne wdrażanie uzyskanych rezultatów pozwala na wprowadzanie realnych zmian w metodach produkcji, dążących w kierunku przywrócenia równowagi w agroekosystemie.

Struktura organizacyjna programu naukowego „Żywność 21” przedstawia się następująco. Na czele programu stoi zarząd, któremu podlega szef programu mający do pomocy w pracach administracyjnych sekretarkę, ekonomistkę oraz dziennikarza utrzymującego m.in. kontakty ze środkami masowego przekazu. Do kierownictwa programu należą także profesorowie odpowiedzialni za poszczególne bloki. Strukturę programu uzupełnia wspomniana wcześniej grupa referencyjna oraz grupa zajmująca się syntezą wyników prac naukowych prowadzonych w wymienionych wcześniej blokach. Za przebieg prac w bloku odpowiedzialny jest profesor będący specjalistą w danym zakresie. Wspomagają go osoby kierujące poszczególnymi projektami w bloku, pełniące też funkcję promotorów.

Dla doktorantów ważny jest kontakt z realiami szwedzkiego życia gospodarczego, dlatego przedstawiciele przemysłu, rolnictwa i władz administracyjnych zainteresowani kontaktami ze środowiskiem naukowym pełnią funkcję mentorów, w stosunku do doktorantów.

Seminaria naukowe mające na celu zaznajomienie się z konkretną problematyką projektów i pracami w sąsiednich blokach są regularnie organizowane przez samych doktorantów lub przez kierownictwo programu „Żywność 21”. Poszerza to wiedzę doktorantów oraz ułatwia współpracę między blokami i poszczególnymi projektami.

Dalekosiężne cele „Żywności 21”

Cele dotyczące bogactw naturalnych

- Energia uzyskana z kopalin: uniezależnienie się od jej źródeł w produkcji podstawowej, tzn. w gospodarstwie.
- Fosfor: minimalne wydobycie ze złóż mineralnych.
- Metale ciężkie: niedozwolona akumulacja metali w glebie.
- Struktura gleby: niedopuszczanie do powstawania nieodwracalnych negatywnych zmian.
- Różnorodność gatunków biologicznych: zachować i pogłębić bioróżnorodność.

Cele dotyczące środowiska naturalnego

- Utrata azotu: w ilościach nie powodujących zanieczyszczenia wód i powietrza.

- Utrata fosforu: w ilościach nie powodujących eutrofizacji.
- Środki ochrony roślin: żadnych pozostałości w glebie i w wodzie, rozwój w kierunku uniezależnienia się od tych środków.
- Gazy cieplarniane: emisja w ilościach nie dopuszczających do wzrostu ich stężenia w atmosferze.
- Pozostałości po środkach weterynaryjnych dla zwierząt: żadnych pozostałości w nawozach naturalnych.

Opieka nad zwierzętami hodowanymi

- Najważniejszym zadaniem jest zagwarantowanie dobrego stanu zdrowia zwierząt hodowlanych oraz stworzenie im warunków do wykazywania naturalnych dla nich zachowań.
- Metody hodowli zwierząt mają dążyć w kierunku uniezależnienia **hodowli** od stosowania środków weterynaryjnych dla zwierząt.

„Żywność 21” – deklaracja programowa

Jakość produkcji		Jakość produktu
Środowisko	Zwierzęta hodowlane	
<ul style="list-style-type: none"> • Żyzność gleby, • Wymywanie subst. odżywczych z gleby, • Gazy cieplarniane, • Emisja amoniaku, • Środki ochrony roślin, • Metale ciężkie, • Energia z kopaliny, • Pozostałości po środkach weterynaryjnych, • Bioróżnorodność. 	<ul style="list-style-type: none"> • Stan zdrowia zwierząt hodowlanych, • Zachowania typowe dla danego gatunku zwierząt hodowlanych, • Środki weterynaryjne w hodowli zwierząt. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensoryczna, • Technologiczna, • Mikrobiologiczna, • Odżywcza, • Żywność wolna od subst. toksycznych.

W programie „Żywność 21” prace badawcze są prowadzone w pięciu blokach:

- Uprawa roślin,
- Hodowla zwierząt,
- Jakość produktów żywnościowych,
- Konsumenci i rolnicy,
- Analiza systemów.

Blok – Uprawa roślin (8 doktorantów)

W bloku tym prowadzone są m.in. badania dotyczące:

- • Demineralizacji, w celu udostępnienia fosforu roślinom,
- Denitrifikacji, czyli uwolnienia azotu w optymalnych ilościach w celu zmniejszenia ilości azotu przenikającego do wód i powietrza,
- Znaczenia mykorrhizy, jako ogniwa między systemem korzeniowym a glebą, zabezpieczającego roślinie dostarczenie fosforu niezbędnego do jej optymalnego rozwoju,
- Obecności kadmu.

Badania nad stratami fosforu z obszarów uprawnych posiadających gleby gliniaste oraz nad wyciekami azotu z obszarów uprawnych posiadających gleby piaszczyste wykazują, że największe są straty fosforu przez makropory na glebach gliniastych, średnio 4 kg/ha. Mniejsze straty fosforu, średnio 0,6 kg/ha mają miejsce na obszarach uprawnych posiadających gleby piaszczyste. Te ostatnie charakteryzują się natomiast dużą przepuszczalnością związków azotowych do wód gruntowych.

Przykłady aktualnych projektów w bloku:

1. Przepływ substancji, minerałów i metali ciężkich w gospodarstwach o różnym ukierunkowaniu produkcji.
2. Modelowanie rozpadu związków mineralnych na polach uprawnych.
3. Zawartość substancji odżywczych i metali ciężkich w oborniku.
4. Kierowanie syntezą i rozpadem substancji występujących w glebie.
5. Emisja gazów cieplarnianych z upraw roślin.
6. Znaczenie mykorrhizy dla zdolności pobierania przez rośliny substancji odżywczych.

Blok – Hodowla zwierząt (8 doktorantów)

W bloku tym prowadzone są badania mające na celu wypracowanie modeli dla optymalnej produkcji zwierzęcej.

Intensywna hodowla zwierząt spowodowała przykładowo wzrost produkcji mleka o 60% i jaj o 100% w latach 1960–1990. Kurczaki żyją obecnie 33 dni, dawniej 84 dni, dochodząc do tej samej masy 1,2 kg. Krowy mleczne miały w swoim życiu średnio 7 laktacji, obecnie co najwyżej 3. Cena tej intensywnej produkcji jest pogorszenie sytuacji zwierząt oraz stany chorobowe: u kurczaków biegunka, u krów – zapalenie wymion, u świń choroby dróg oddechowych itp.

W Szwecji obowiązuje generalny zakaz stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt, natomiast nie w leczeniu zwierząt. Bardzo istotne jest uniezależnienie hodowli zwierząt od stosowania antybiotyków z powodu ryzyka wytworzenia rezystencji na antybiotyki u człowieka. Sposobami, które mogą ograniczyć konieczność stosowa-

nia antybiotyków jest odmienne projektowanie budynków hodowlanych oraz zwrócenie większej uwagi na karmę dla zwierząt.

Przykłady aktualnych projektów w bloku:

Optymalne wykorzystanie potencjału biologicznego zwierząt.

Jak wpływa częstotliwość wykarmu świń na stan ich zdrowia i produktywność?

Nowe systemy produkcji polepszające sytuację zwierząt a jednocześnie cechujące się dobrą produktywnością.

Zachowanie zwierząt typowe dla danego gatunku.

Blok – Jakość produktów żywnościowych (5 doktorantów)

Jakość żywności jest pojęciem kompleksowym i zawiera zarówno parametry obiektywne jak i subiektywne, np. cele produkcji chroniącej środowisko mogą zmieniać pojęcie jakości żywności. Blok ten jest jakby organem kontrolnym dla pozostałych bloków i bada jakość produktów żywnościowych wyprodukowanych w nowym systemie.

Badania prowadzone w tym bloku mają dać odpowiedź na pytania, czy i jak zmieni się jakość produktu, gdy zmieni się jakość produkcji. Nie ma bowiem żadnej gwarancji, że będzie ona lepsza, jak również nie ma też żadnych ram porównawczych dla produktów pochodzących z poszczególnych systemów upraw. Badania w chwili obecnej są prowadzone głównie na: mleku, mięsie wołowym, wieprzowym oraz pszenicy. Studiuje się m.in. związek między:

- Składem paszy a rodzajem kwasów tłuszczowych w mięsie,
- Rodzajem kwasów tłuszczowych, ilością przeciwutleniaczy, a powstawaniem substancji mutagennych w czasie smażenia mięsa,
- Hodowlą zwierząt na wolnym wybiegu a jakościowym składem tłuszczu.

W bloku tym bada się jakość odżywcza, technologiczną, sensoryczną, jak również występowanie kadmu. Metody analizy żywności obejmują także analizę obrazową.

Przykład aktualnych projektów w bloku:

1. Ocena jakości produktów roślinnych,
2. Ocena produktów mięsnych,
3. Ocena mleka,
4. Jakość sensoryczna produktów,
5. Zawartość kadmu w żywności.

Przyrost kadmu w glebie w Szwecji jest rzędu 0,1% na rok (50% z powietrza, 50% z nawozów fosforowych). W placówce naukowo-badawczej w Öjebyn na północy Szwecji prowadzona jest hodowla 50 krów w systemie ekologicznym i 50 krów w systemie konwencjonalnym. Mleko badane jest regularnie na zawartość kadmu. Z każdego systemu 20–30 krów przeznaczonych jest na ubój, a uzyskana krew, mięso, wątroba, nerki i wymiona badane są na zawartość kadmu. Również na południu Szwecji

bada się występowanie kadmu w paszach, ich pochodzenie, ilość kadmu w ziemi, w krwi i mięsie trzody chlewnej, jak również bada się występowanie kadmu w krwi hodowcy zwierząt.

Blok – Konsumenci i rolnicy (5 doktorantów)

Badania dotyczące zachowań konsumenckich są stosunkowo młodą dyscypliną naukową.

W centrum uwagi w tym bloku stoi aktywne uczestnictwo zarówno rolników, jak i konsumentów w kształtowaniu nowego systemu. Badania w tym bloku mają stworzyć bazę naukową w oparciu o którą można będzie opracować efektywne metody współpracy oraz stworzyć podstawę do dialogu między związkami rolników, przemysłem spożywczym, władzami i handlem. Nowe metody produkcji mają nie tylko być akceptowane przez producentów i konsumentów, ale nawet atrakcyjne dla nich. Również przemysł i handel powinny być świadome roli jaką odgrywają i aktywnie uczestniczyć w przemianach.

Przykład aktualnych projektów w bloku:

1. Opinie konsumentów o jakości żywności pochodzącej z różnych systemów produkcji.
2. Stopień akceptacji przez konsumentów żywności wyprodukowanej w różnych systemach uprawnych.
3. Poglądy konsumentów na oznakowanie żywności.
4. Udział rolnika w rozwoju nowego systemu produkcji:
 - stosunek rolnika do nowego systemu upraw oraz działanie rolnika zmierzające do wdrożenia nowych metod produkcji w praktyce,
 - motywacje rolnika, jego doświadczenia i możliwości we wzięciu udziału w programie produkcji mleka i mięsa metodami chroniącymi środowisko,
 - proces podejmowania decyzji przez rolnika.

Celem tych badań jest analiza, rozwój oraz zastosowanie metod sprzyjających aktywnemu udziałowi rolnika w rozwoju nowego systemu produkcji.

Blok – Analiza systemów (4 doktorantów)

W bloku tym gospodarstwo znajduje się w centrum uwagi, a prowadzone badania dotyczą:

- kompleksowych analiz procesów sterowania gospodarstwem,
- kompleksowych analiz przepływu substancji odżywczych, substancji szkodliwych, oraz produktów odpadów w gospodarstwie.

Konflikt różnych interesów, a w szczególności ich pogodzenie i znalezienie odpowiednich rozwiązań, jest centralnym problemem w analizie systemów. Prowadzone badania mają dać odpowiedź na pytanie: w jakim stopniu jest to obecnie realne, by

gospodarstwo mogło się obyć bez używania energii pochodzącej z kopalin? Jakie będą tego konsekwencje? Jak np. zmniejszenie pogłowia krów mlecznych oddziałuje na inne czynniki w gospodarstwie? Jak przedstawienie produkcji na stosowanie metod chroniących środowisko wpłynie na sytuację rolnika: ekonomiczną, socjalną, jego stosunek do władz, przepisów etc.

Obecnie trzy gospodarstwa są studiowane jako modele za pomocą symulacji elektronicznej. W przyszłości modele te mają być testowane w praktyce.

Dalekosiężny cel bloku:

Wypracować praktyczne i optymalne rozwiązania w gospodarstwach, współpracując z rolnikami w celu możliwie jak najsprawniejszego wdrożenia nowych **metod** produkcji w produkcji podstawowej, tak, aby w perspektywie stworzyć **system** produkcji rolnej funkcjonujący zgodnie z zasadami ekorozwoju. ☒

IV SESJA MŁODEJ KADRY NAUKOWEJ PTTŻ

**NOWOCZESNE METODY EKSPERYMENTALNE
W BADANIACH ŻYWNOŚCI,
RYNIA N. ZALEWEM ZEGRZYŃSKIM 31.05.- 02.06.1999**

W dniach 31.05 1999 – 2.06.1999 r. w Ryni odbyła się IV Sesja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ nt.: “Nowoczesne metody eksperymentalne w badaniach żywności”. Wzięło w niej udział 103 uczestników, w tym znaczna grupa doktorantów, z następujących ośrodków: WSM w Gdyni; Politechnika Gdańska; ART i IRZBŻ PAN w Olsztynie; Politechnika Łódzka; SGGW, IPMiT i IBPRS w Warszawie; AR we Wrocławiu, AR w Lublinie, AR w Szczecinie, AR w Krakowie oraz AR w Poznaniu. Towarzyrzyło im liczne grono profesorów, wśród nich opiekunowie i kierownicy studiów doktoranckich. Sesjom referatowym przewodniczyli młodzi uczestnicy, także spośród nich wybrane były komisje oceniające sesje posterowe.

Wygłoszono 18 referatów i zaprezentowano 73 plakaty w siedmiu sekcjach problemowych:

1. Enzymy i ich analityczne i biologiczne zastosowania.
2. Drożdże, ich charakterystyka i zastosowania.
3. Właściwości fizykochemiczne i reologiczne dodatków funkcjonalnych i produktów żywnościowych.
4. Produkty pochodzenia zwierzęcego; identyfikacja, jakość, metody pomiaru.
5. Aktywność antyoksydacyjna i stabilność oksydacyjna substratów i produktów żywnościowych.
6. Zagadnienia żywieniowe, bezpieczeństwo żywności, inne.
7. Inżynieria procesowa i metody pomiaru właściwości fizykochemicznych i fizycznych.

Zaprezentowano dwa referaty towarzyszące P. Iwona Kihlberg z Department of Domestic Sciences, Uppsala University (Szwecja) przybliżyła uczestnikom podstawy i zadania organizacji szwedzkiego interdyscyplinarnego programu naukowego pt.: “Żywność 21”. Badania prowadzone w ramach tego programu mają na celu znalezienie optymalnych i kompleksowych rozwiązań dla szwedzkiego rolnictwa. Są one prowadzone we współpracy pomiędzy naukowcami, producentami żywności i konsumentami.

Prof. Henryk Kostyra z IRZBŻ PAN w Olsztynie omówił wybrane aspekty przedstawiania wyników prac naukowych w referacie pt.: "Sztuka popularyzacji wiedzy". Referat ten, wskazujący na celowość i konieczność popularyzacji wyników prac i doświadczeń, podkreślał zależność treści i formy wystąpienia od odbiorcy oraz skłaniał słuchaczy do głębokich refleksji.

Każde z wystąpień wzbudzało szerokie zainteresowanie, jak również stanowiło kanwę do ożywionej dyskusji z udziałem zarówno młodych uczestników, jak i kadry profesorskiej. Przedstawione referaty i postery prezentowały na ogół wysoki poziom merytoryczny, charakteryzowały się trafnym doбором materiału i starannym opracowaniem graficznym. Spośród prezentowanych plakatów wyróżniono 12 prac; sześć przez komisje oceniające i sześć w wyniku plebiscytu wśród uczestników. Plakaty oceniane były pod względem merytorycznym odnośnie aktualności i atrakcyjności tematyki, trafności doboru metod analitycznych oraz ich nowoczesności, ale również pod kątem ich wykonania, doboru treści i czytelności.

Zainteresowanych zapraszam do przeczytania strony internetowej Sekcji Młodych adres: <http://snack.p.lodz.pl/smpttz/>, gdzie zamieszczone są tematy referatów i szczegółowe sprawozdanie z sesji posterowych, jak również informacje dotyczące Sekcji Młodych.

Na zakończenie odbyły się wybory władz Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ na następną kadencję. W skład nowego zarządu weszli: Ewa Mrówka (IBPRS Warszawa) – przewodnicząca, Maciej Wojtczak (PŁ) – z-ca przewodniczącego oraz członkowie: Iwona Jabłonowska (AR Szczecin), Agnieszka Łatosz (IRZiBŻ, PAN Olsztyn), Agnieszka Maj (AR Wrocław), Joanna Newerli-Guz (WSM Gdynia), Maria Spera (IBPRS Warszawa), Krzysztof Kołodziejczyk (PŁ, Łódź), Stanisław Kalisz (AR Wrocław), Celina Mateńczuk (AR Szczecin).

Czwarta Sesja Sekcji Młodych skłoniła do refleksji nad dotychczasowym kształtem, treścią i formą spotkań. Dotychczasowe spotkania miały charakter zarówno warsztatów naukowych, jak i konferencji prezentujących wybrane trendy w nauce o żywności. Doświadczenia zebrane podczas czterech lat istnienia Sekcji pozwoliły na postawienie pytań dotyczących zasadności koncepcji powstania Sekcji Młodych oraz przyszłych spotkań. Zagadnienia te dyskutowano w posumowaniu Sesji. Uczestnicy zgodzili się co do celowości ich kontynuowania w formie konferencji, podkreślając znaczenie możliwości pierwszych prezentacji wyników swoich prac w gronie rówieśników, jako cenne doświadczenie przed prezentacją ich na szerszym i bardziej wymagającym forum konferencyjnym.

Nie zmienia to faktu, że Sekcja jest otwarta na dalsze propozycje i inicjatywę WSZYSTKICH ZAINTERESOWANYCH.

**Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji
Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**

PREZES/ODDZIAŁ	ADRES
Prof. dr hab. Nina Baryłko-Pikielna Zarząd Główny	Polskie Towarzystwo Technologów Żywności ul. Rakowiecka 36, 02-532 WARSZAWA Tel./Fax (+22) 646 68 72
Prof. dr hab. Piotr Bykowski Oddział Gdański	ul. Kołłątaja 1 (MIR), 81-332 GDYNIA Tel.: (+58) 620 5211; Fax.: (+58) 620 28 31
Prof. dr hab. Zdzisław Targoński Oddział Lubelski	ul. Skromna 8 (AR), 20-704 LUBLIN Tel.: (+81) 52 54 770; Fax.: (+81) 533 57 33
Prof. dr hab. Jadwiga Wilska-Jeszka Oddział Łódzki	ul. Stefanowskiego 9/10 (PŁ) 90-942 ŁÓDŹ Tel.: (+42) 313 433/313 435; Fax. (+42) 313 402
Prof. dr hab. Tadeusz Sikora Oddział Małopolski	ul. Rakowicka 27 (AE), 31-510 KRAKÓW Tel./Fax: (+12) 421 38 34
Dr hab. Andrzej Kunczewicz Oddział Olsztyński	Plac Cieszyński 1 (ART.), 10-957 OLSZTYN Tel.: (+89) 523 37 03; Tel./Fax (+89) 523 35 54
Prof. dr Kazimierz Lachowicz Oddział Szczeciński	ul. Kazimierza Królewicza 3 (AR), 71-550 SZCZECIN Tel.: (+01) 423 10 61
Dr hab. Danuta Kołożyn - Krajewska Oddział Warszawski	ul. Nowoursynowska 166 (SGGW), 02-787 WARSZAWA Tel.: (+22) 843 90 41 w. 1200
Prof. dr hab. Edward Pospiech Oddział Wielkopolski	ul. Wojska Polskiego 31 (AR), 60-624 POZNAŃ Tel.: (+61) 848 72 60, Fax.: (+61) 848 71 46
Prof. dr hab. Teresa Smolińska Oddział Wrocławski	ul. Norwida 25/27 (AR), 50-375 WROCŁAW Tel.: (+71) 205 284; Fax.: (+71) 205 273
SEKCJE	
Prof. dr hab. Barbara Szteke Analizy i Oceny Żywności	ul. Rakowiecka 36 (IBiPR-S), 02-532 WARSZAWA Tel. (+22) 499 167
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	ul. Nowoursynowska 166 (SGGW), 02-787 WARSZAWA Tel.: (+22) 843 90 41
Dr hab. Włodzimierz Dolata Technologii Mięsa	ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 POZNAŃ Tel.: (+61) 848 72 52; Fax: (+61) 848 71 45
Prof. dr hab. Krzysztof Krygier Technologii Tłuszczów	ul. Grochowska 272 (SGGW), 03-849 WARSZAWA Tel.: (+22) 810 18 42; e-mail: tzyktznoiks@alfa.aggw.waw.pl
Mgr Ewa Mrówka Młodej Kadry	ul. Rakowiecka 36 (Instytut Biotechnologii Przem. Rolnego i Spoż.), 02-532 WARSZAWA Tel.: (+22) 606 38 18

Informacja dla Autorów

Pragniemy przekazać Państwu podstawowe informacje, które powinny ułatwić pracę redakcji i ujedynolnić wymagania wobec nadsyłanych materiałów.

1. Będziemy na naszych łamach zamieszczać zarówno oryginalne prace naukowe, jak i artykuły przeglądowe, które będą miały ścisły związek z problematyką żywności.
2. Planujemy również zamieszczać recenzje podręczników i monografii naukowych, omówienia z naukowych czasopism zagranicznych, sprawozdania z konferencji naukowych itp.
3. Prace prosimy nadsyłać na dyskietce wraz z wydrukowanymi 2 egzemplarzami (format A4, maksymalnie 30 wierszy na stronie, 60 znaków w wierszu).
4. Objętość prac oryginalnych, łącznie z tabelami, rysunkami i wykazem piśmiennictwa nie powinna przekraczać 12 stron.
5. Na pierwszej stronie nadesłanej pracy (1/3 od góry pierwszej strony należy zostawić wolną, co jest potrzebne na uwagi wydawniczo-techniczne) należy podać: pełne imię i nazwisko Autora(ów), tytuł pracy, nazwę i adres instytucji zatrudniającej Autora(ów), tytuł naukowy.
6. Publikacja winna stanowić zwięzłą, dobrze zdefiniowaną pracę badawczą, a wyniki należy przedstawić w sposób możliwie syntetyczny (dotyczy oryginalnych prac naukowych).
7. Do pracy należy dołączyć streszczenia w języku polskim i w języku angielskim. Streszczenia powinny zawierać: imię i nazwisko Autora(ów), tytuł pracy i treść – maksymalnie 10 wierszy.
8. Nadsyłane oryginalne prace naukowe powinny zawierać następujące rozdziały: Wstęp, Materiał i metody, Wyniki i dyskusja, Wnioski (Podsumowanie), Literatura.
9. Literatura powinna być cytowana ze źródeł oryginalnych. Spis literatury winien być ułożony w porządku alfabetycznym nazwisk autorów. Każda pozycja powinna zawierać kolejno: liczbę porządkową, nazwisko i pierwszą literę imienia autora(ów), tytuł pracy, tytuł czasopisma, tom, rok, strona początkowa. Pozycje książkowe powinny zawierać: nazwisko i pierwszą literę imienia autora(ów), miejsce i rok wydania, tom. Informacje zamieszczone w alfabecie niełacińskim należy podawać w transliteracji polskiej. Spis literatury nie powinien zawierać więcej niż 30 najważniejszych pozycji.
10. Tabele i rysunki winny być umieszczone na oddzielnych stronach. Rysunki powinny być wykonane na kalce tuszem lub wydrukowane na drukarce laserowej. Każdy rysunek powinien być numerowany kolejno na odwrocie ołówkiem, należy również podawać nazwisko Autora i tytuł pracy, w celu łatwiejszej identyfikacji. **Podpisy rysunków i tytuły tabel oraz objaśnienia w tabelach i rysunkach należy podać w językach polskim i angielskim.** Rysunki wykonane za pomocą komputera prosimy dołączyć na dyskietce w formacie TIF lub WMF.
11. Materiałem ilustracyjnym mogą być również fotografie, wyłącznie czarno-białe.
12. Korektę prac wykonuje na ogół redakcja na podstawie maszynopisu pracy zakwalifikowanej do druku, uwzględniając uwagi recenzenta i wymagania redakcji. W przypadku daleko idących zmian, prace będą przesyłane Autorom.
13. Za prace ogłoszone w naszym kwartalniku Autorzy nie otrzymują honorarium, natomiast otrzymują egzemplarz autorski.
14. Materiały przesłane do redakcji nie będą zwracane Autorom.

CONTENTS

From the Editor	5
EWA MRÓWKA, JOANNA ROZMIERSKA, ANTONINA KOMOROWSKA, KRYSTYNA STECKA	
Functional Properties of Selected Yeast Products	7
JOANNA CHMIELEWSKA, JOANNA KAWA-RYGIELSKA	
Genetic Differentiation of Ksylose Fermenting Yeast Strains	17
ALINA KRYSZYNOWICZ, WOJCIECH CZAJA, STANISŁAW BIELECKI	
Biosynthesis of Bacterial Cellulose and its Potential Application.....	22
WOJCIECH CZUB, MARIANNA TURKIEWICZ	
Biosynthesis of Scleroglucan by <i>Sclerotium sp.</i> Strain	35
MAREK PRIMIK, MAŁGORZATA GNIEWOSZ, WANDA DUSZKIEWICZ-REINHARD	
Obtainment of Haploid Forms of Brewing Yeast Strains.....	44
AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ TRZMIEL	
The Immobilization of Subtilisins from Three Bacteria Species: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> and <i>B. alcalophilus</i>	50
AGNIESZKA MAJ, DANUTA WITKOWSKA	
Study on Degradation of β -Glucans with <i>Trichoderma</i> Extracellular Hydrolases	59
JOANNA KAWA-RYGIELSKA	
Application of PCR Method to Differentiation of Industrial Yeast.....	69
MARTA PASŁAWSKA	
The Physiological State Of Immobilized Yeast Cells In Ethanol Fermentation.....	76
DAGMARA MIERZEJEWSKA, LUCJAN JĘDRYCHOWSKI	
Production, Characterization and Applications of Monoclonal Antibodies in Laboratory Analysis	82
ANETA WIDERA	
Characterization Of Starch Quality And Rheological Properties of Dough of Spring Barley Varieties	96
RAFAŁ WOŁOSIAK, ELWIRA WOROBIJ	
Antioxidant Activity of Pea Protein Isolate and Hydrolysates	105
ADRIANNA MIKOŁAJCZAK, BEATA DRUŻYŃSKA	
Antioxidant Properties of Polyphenols Extracted from Coloured Bean Seed Coats	112

STANISŁAW KALISZ	
Utilization of Phenolic Compounds Extracted from Skullcap (<i>Scutellaria bajkalisensis</i>) in Chokeberry Wines Stabilization.....	118
EWA MAJEWSKA	
Usage of Conductometry for Ash Content Measurement in Honey	129
EWA MALCZYK	
Influence of Feeding System on Oxidative Processes Occuring in Chicken Meat during Refrigeration Storage	136
MACIEJ OZIEMBŁOWSKI	
Parameters of Thermomechanical Analysis of Liquid Whole Egg	151
MACIEJ WOJTCZAK, BOGUSŁAW KRÓL	
Changes of the Content of Selected Impurities in White Sugar during the 1998/99 Campaign.....	160
IWONA KIHLEBERG	
Swedish Interdisciplinary Scientific Programme "Food 21"	169
EWA MRÓWKA	
New Experimental Methods of Food Research – Rynia at Zegrzyński Bay 31.05 – 02.06.1999	177
Addresses of Main Board, Brands and Sections of PTTŽ.....	179
Instruction to Authors.....	180

FOOD

A scientific quarterly

No 3(20)Suppl.

Kraków 1999

Vol. 6

Only reviewed papers are published

Covered by: AGRO-LIBREX and Chemical Abstracts Service and IFIS

ISSN 1425-6959

Wydanie czasopisma dofinansowane jest ze składek członków wspierających Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności: **Agros Holding SA** Warszawa; **Akwawit** Leszno; **Alima-Gerber SA** Rzeszów; **Animex SA** Warszawa; **Bielmar** Bielsko-Biała, **Biolacta Texel-Rhodia** Olsztyn, **Bolmar** Bodaczów, **Celiko SA** Poznań; **Chio Lilly Snak Foods Sp. z o.o.**; **Coca-Cola Poland Services Ltd** Warszawa; **Hortimex Sp. z o.o.** Konin; **Krajowe Stowarzyszenie Mleczarzy** Warszawa, **Nadodrzańskie Zakłady Przemysłu Tłuszczowego** Brzeg; **Pekpol SA** Warszawa; **Pepsico Trading Sp. z o.o.** Warszawa; **Piast Browary** Wrocław; **Pozmeat SA** Poznań; **Regis Sp. z o.o.** Wieliczka; **Rolimpex SA** Warszawa; **PHU SIC** Gościnnie, **Spółdzielnia Produkcji Piekarskiej i Ciastkarskiej** Kraków; **Tchibo** Warszawa; **Technex GmbH** Szczecin; **Van den Bergh-Foods Polska SA** Szopienice; **E.Wedel SA**, Warszawa, **Winiary SA** Kalisz, **Zakłady Mięsne Nisko SA**, Nisko, **Zakłady Przemysłu Tłuszczowego** Warszawa.

Warunki prenumeraty

Szanowni Państwo,
uprzejmie informujemy, że przyjmujemy zamówienia na prenumeratę naszego kwartalnika, zarówno Czytelników indywidualnych, jak i od instytucji, co powinno Państwu zapewnić bieżące otrzymywanie kolejnych wydawanych przez nas numerów.
Cena jednego egzemplarza wynosi 10 zł.

Zamówienia na prenumeratę, jak i na poszczególne numery prosimy kierować na adres Redakcji:

Redakcja Kwartalnika

ŻYWNOSĆ

31-425 Kraków, Al. 29 Listopada 46

Nr konta: PKO | O/Kraków 10202892-164353-270-1-111