ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

9(2) 2010

Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Mikołaj Protasowicki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Opracowanie redakcyjne i korekta:
Janina Szydłowska
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie
Alina Gebel

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644–065X

Wydanie publikacji dofinansowane ze środków
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2010

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax 71 328–12–77
e-mail: wyd@up.wroc.pl http://www.up.wroc.pl

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 2,4. Ark. druk. 2,25.
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM *Acta Sci. Pol., Biotechnologia 9(2) 2010, 3-10*

DYNAMIKA I EFEKTY KOŃCOWE POWTÓRZENIOWYCH FERMENTACJI BRZECZEK PIWOWARSKICH O PODWYŻSZONEJ ZAWARTOŚCI EKSTRAKTU

Paweł Zarychta[1], Ewelina Dziuba[2], Barbara Foszczyńska[2], Joanna Chmielewska[2]

[1]Browar Konstancin Sp. z o.o.

[2]Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Badano wpływ wielokrotnego zawracania biomasy drożdży piwowarskich na dynamikę i efekty końcowe fermentacji brzeczek typu HG (16%) i VHG (20%). Stwierdzono, że drożdże fermentacji górnej (*S. cerevisiae* I-S.c./57) wykazywały lepszą dynamikę fermentacji w porównaniu ze szczepem fermentacji dolnej (*S. carlsbergensis* I--S.ca./13). Drożdże utrzymywały dobrą dynamikę fermentacji brzeczek o stężeniu 16%, także w procesach wielokrotnego zawracania biomasy. Dalsze zwiększanie ekstraktu brzeczek do 20% wywierało negatywny wpływ na dynamikę procesu oraz stopień odfermentowania ekstraktu w kolejnych cyklach fermentacyjnych.

Słowa kluczowe: drożdże piwowarskie, brzeczki stężone (HG i VHG), fermentacja powtórzeniowa

WSTĘP

Prowadzenie fermentacji z zawracaniem biomasy jest powszechną praktyką stosowaną w browarach. Po zakończeniu fermentacji drożdże są zbierane, przemywane w zakwaszonym środowisku i przekazywane do następnego nastawu. Takie postępowanie powoduje poddanie drożdży rozmaitym szokom zarówno fizycznym (wirowanie, pompowanie), jak i fizjologicznym. W wyniku niesprzyjających warunków dochodzi do zakłócenia normalnego przebiegu cyklu życiowego komórki. Komórki znajdujące się pod koniec fermentacji w stacjonarnej fazie wzrostu przenoszone są do stanu spoczynkowego (ewentualne przechowywanie przed podaniem do brzeczki) i następnie wprowadzane do nowego środowiska. Jeżeli w nowym środowisku występuje podwyższone ciśnienie osmotyczne, powodowane prowadzeniem procesu metodą HG lub VHG,

Adres do korespondencji – Corresponding author: Ewelina Dziuba, Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa, Zakład Technologii Fermentacji, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: Ewelina.Dziuba@wnoz.up.wroc.pl

komórki napotykają na stres osmotyczny. Z kolei pod koniec fermentacji obserwowany jest stres związany z dużym stężeniem etanolu powstałego z dodatkowej porcji węglowodanów.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wielokrotnego zawracania biomasy drożdży piwowarskich na dynamikę i efekty końcowe fermentacji brzeczek o podwyższonej, dodatkiem hydrolizatów skrobiowych, zawartości ekstraktu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły:

- szczepy drożdży piwowarskich pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie:
  - drożdże fermentacji dolnej *Saccharomyces carlsbergensis I-S.ca./13* (oznaczone jako I-S.ca./13)
  - drożdże fermentacji górnej *Saccharomyces cerevisiae I-S.c./57* (oznaczone jako I-S.c./57)
- media fermentacyjne – brzeczki uzyskane w warunkach laboratoryjnych z 12% brzeczki słodowej (ze słodu pilzneńskiego pochodzącego ze słodowni w Strzegomiu) zatężonej hydrolizatami skrobiowymi G lub M do zawartości ekstraktu 16% (HG) i 20% (VHG). Skład hydrolizatów skrobiowych podano w tabeli 1.

Tabela 1. Skład hydrolizatów skrobiowych
Table 1. Composition of starch hydrolizates

Syrop Syrup	Sucha masa Dry matter [%]	pH	Glukoza Glucose [%]	Maltoza Maltose [%]	Maltotrioza Maltotriose [%]
G	73–74	3,5–6,0	94	–	–
M	79,9–81,2	4,0–5,0	0–7	45–56	0–25

G – hydrolizat wysokoglukozowy – G – high maltose syrup
M – hydrolizat wysokomaltozowy – M – high glucose syrup

Wszystkie rodzaje brzeczek poddano chmieleniu z zastosowaniem granulatu chmielowego o zawartości 10% α-kwasów, pochodzącego z Browaru „Piast" we Wrocławiu. Następnie przeprowadzono serie fermentacji powtórzeniowych brzeczek z udziałem szczepów dolnej (I-S.ca./13) i górnej fermentacji (I-S.c./57). Proces fermentacji dolnej prowadzono w temperaturze 9–11°C przez 10–11 dni, zaś fermentacji górnej w temperaturze 20–25°C przez okres 7–8 dni. Wykonano trzy cykle fermentacji, określając je w pracy jako: F I, F II i F III. W fermentacji F II i F III stosowano biomasę z poprzedniego nastawu, przemytą 2% kwasem ortofosforowym (5 min, pH 2,5) oraz wodą destylowaną.

W każdej dobie fermentacji oznaczano zawartość ekstraktu pozornego metodą refraktometryczną, a po zakończonej fermentacji – zawartość etanolu metodą piknometryczną. Obliczono stopień odfermentowania brzeczek.

WYNIKI

Warunki stresowe, związane z zawracaniem biomasy, mogły wywierać niekorzystny wpływ na kondycję drożdży stosowanych do kolejnej fermentacji zatężonych brzeczek, a w efekcie spowodować spowolnienie procesu odfermentowywania składników ekstraktu.

Podwyższenie zawartości ekstraktu brzeczki do 16% nie wywołało zasadniczych zmian tempa procesu fermentacji (rys. 1). Szczep I-S.ca./13 powoli wykorzystywał składniki ekstraktu, zmniejszając ich zawartość w ciągu 8 dni procesu do 10,5–12,0% (rys. 1a). Nie stwierdzono obniżenia się tej szybkości w kolejnych cyklach fermentacyjnych. Szczep I-S.c/57 cechował się lepszą dynamiką fermentacji. Drożdże te wykorzystały zasadniczą ilość ekstraktu w czasie pierwszych 3 dni procesu, pozostały ekstrakt został następnie wolno odfermentowany do poziomu 7,4–9,3% (rys. 1b). Stwierdzono, że w początkowym okresie drugiego (F II), a zwłaszcza trzeciego cyklu (F III), dynamika fermentacji z udziałem szczepu I-S.c/57 była nieco słabsza. Jednak przebieg dalszej części procesu wskazywał, że drożdże zaadaptowały się dobrze do warunków środowiska.

Nie wykazano istotnych różnic między aktywnością drożdży w 16% brzeczkach z dodatkiem hydrolizatu G lub M. Różnice w szybkości zużywania ekstraktu między kolejnymi fermentacjami powtórzeniowymi były również niewielkie, mogły być związane ze składem brzeczki.

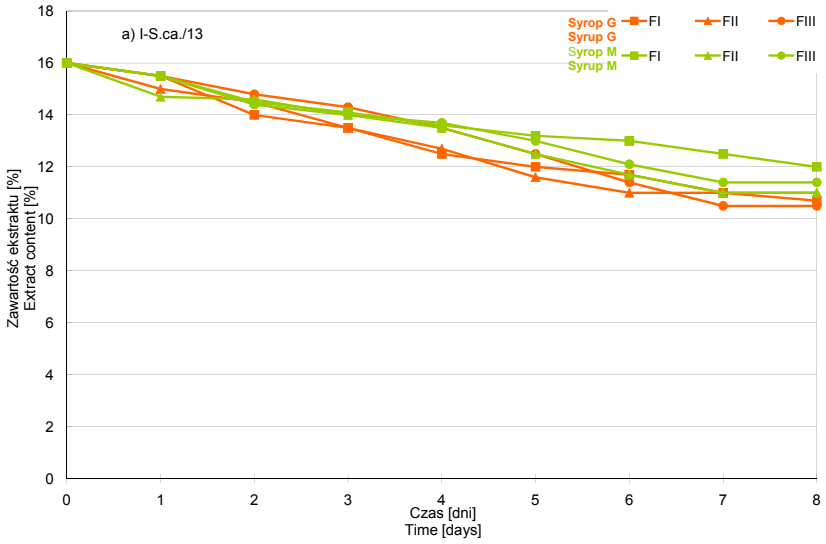
Należy podkreślić, że drożdże górnej fermentacji (I-S.c/57), w porównaniu ze szczepem dolnej fermentacji (I-S.ca./13), lepiej tolerowały podwyższone ciśnienie osmotyczne i w większym stopniu odfermentowały brzeczkę.

Zastosowanie hydrolizatów skrobiowych w celu podwyższenie stężenia ekstraktu brzeczek do 20% spowodowało spowolnienie fermentacji w stosunku do brzeczek o niższej gęstości. Znaczące osłabienie tempa wykorzystania cukrów nastąpiło w II cyklu fermentacji, zwłaszcza z udziałem szczepu I-S.ca./13 (rys. 2a). W przefermentowanych brzeczkach pozostawała większa, niż w poprzednim cyklu ilość ekstraktu. W 5., 6. dobie fermentacji obserwowano znaczne wyhamowanie tempa procesu. Dotyczyło to obu badanych szczepów drożdży, jak i fermentacji powtórzeniowych. Podobnie jak w brzeczce o stężeniu 16% szczep I-S.c./57 wykazywał większą tolerancję na ciśnienie osmotyczne środowiska. Drożdże te wykorzystywały dużą część ekstraktu w czasie trzech pierwszych dni, następnie wolno fermentowały pozostały ekstrakt (rys. 2b).

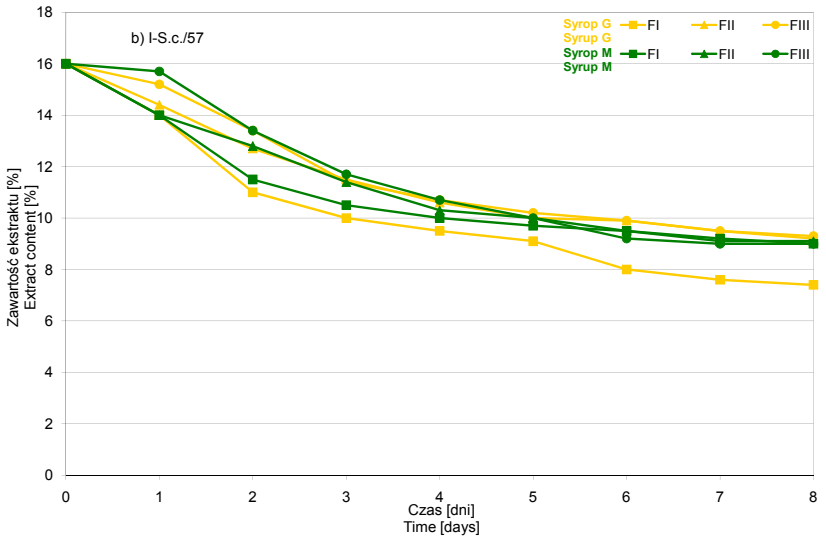
Drożdże w środowisku o podwyższonej zawartości cukrów wytwarzały większe ilości etanolu. Ilość wydzielanego etanolu malała wraz z kolejnymi cyklami fermentacyjnymi (tab. 3). Szczególnie widoczne to było w przypadku szczepu I-S.ca./13 podczas trzeciego cyklu fermentacyjnego (F III) 16 i 20% brzeczek z dodatkiem syropu wysokomaltozowego M (odfermentowanie 35 i 29%). Podobnie szczep I-S.c./57 wraz z kolejnymi fermentacjami wykazywał słabszą zdolność do tworzenia alkoholu etylowego. Szczep ten, niezależnie od rodzaju hydrolizatu i wielkości jego dodatku, produkował znacznie większe ilości etanolu (5,10–7,60%) w porównaniu ze szczepem dolnej fermentacji (3,66–6,97%).

Podsumowując, można stwierdzić, że szczep górnej fermentacji I-S.c./57 lepiej tolerował podwyższone stężenie środowisk fermentacyjnych niż szczep fermentacji dolnej. Nie obserwowano znaczącego spowolnienia fermentacji z udziałem tego szczepu. Drożdże I-S.c./57 wykazały również oporność na podwyższone stężenie etanolu, będące wynikiem wyższej zawartości cukru w podłożu.

a)



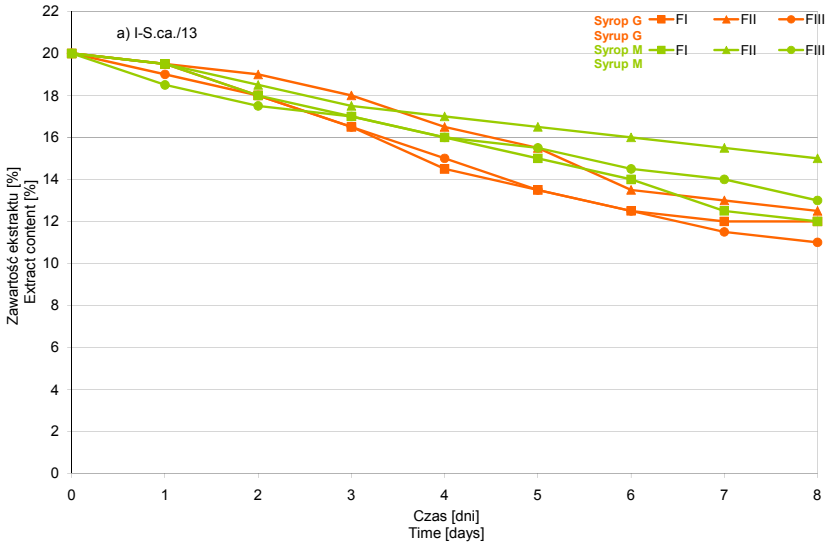
b)



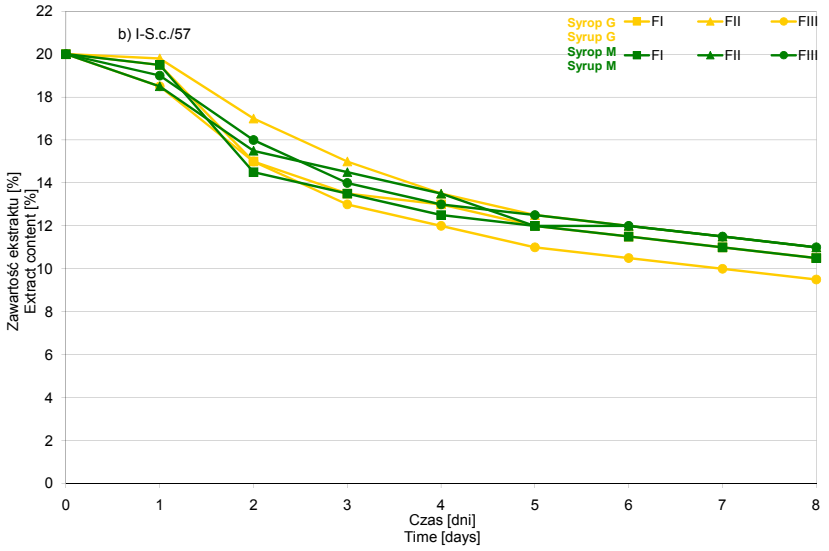
Rys. 1. Przebieg kolejnych (FI, FII, FIII) fermentacji brzeczek typu HG (16 %) z użyciem drożdży dolnej fermentacji I-S.ca./13 (a) oraz drożdży górnej fermentacji I-S.c./57 (b)

Fig. 1. Performance of serial (FI, FII, FIII) repitching fermentations of HG worts (16 %) with bottom-fermenting yeast strain I-S.ca./13 (a) and top-fermenting yeast strain I-S.c./57 (b)

a)



b)



Rys. 2. Przebieg kolejnych (FI, FII, FIII) fermentacji brzeczek typu VHG (20 %) z użyciem drożdży dolnej fermentacji I-S.ca./13 (a) oraz drożdży górnej fermentacji I-S.c./57 (b)

Fig. 2. Performance of serial (FI, FII, FIII) repitching fermentations of VHG worts (20 %) with bottom-fermenting yeast strain I-S.ca./13 (a) and top-fermenting yeast strain I-S.c./57 (b)

Tabela 2. Zawartość etanolu [% obj.] po zakończeniu powtórzeniowych fermentacji brzeczek HG (16%) i VHG (20%)
Table 2. Ethanol content [% vol.] after serial repitching fermentations of HG (16%) and VHG (20%) worts

Syrop Syrup	Stężenie brzeczki Wort concentration [%]	Szczep I-S.ca./13 Strain I-S.ca./13			Szczep I-S.c./57 Strain I-S.c./57		
		Fermentacja Fermentation					
		F I	F II	F III	F I	F II	F III
G	16	5,11	4,23	4,01	6,24	5,81	5,10
M		5,90	3,88	3,66	5,90	5,74	5,66
G	20	5,53	5,32	4,87	7,51	7,21	6,92
M		6,97	4,10	3,88	7,60	7,38	6,49

Tabela 3. Stopień odfermentowania ekstraktu [%] po zakończeniu powtórzeniowych fermentacji brzeczek HG (16%) i VHG (20%)
Table 3. Degree of extract attenuation [%] after serial repitching fermentations of HG (16%) and VHG (20%) worts

Syrop Syrup	Stężenie brzeczki Wort concentration [%]	Szczep I-S.ca./13 Strain I-S.ca./13			Szczep I-S.c./57 Strain I-S.c./57		
		Fermentacja Fermentation					
		F I	F II	F III	F I	F II	F III
G	16	49	40	38	59	55	48
M		56	37	35	57	55	54
G	20	41	40	36	57	54	51
M		52	30	29	57	55	48

Wykorzystanie poszczególnych cukrów przez oba szczepy drożdży piwowarskich podczas fermentacji brzeczek typu HG i VHG będzie tematem odrębnej publikacji.

DYSKUSJA

Do badania aktywności fermentacyjnej drożdży piwowarskich w fermentacjach powtórzeniowych brzeczek HG (16%) i VHG (20%) wybrano drożdże fermentacji dolnej *S. carlsbergensis I-S.ca./13* i drożdże fermentacji górnej *S. cerevisiae I-S.c./57*, opierając się na wcześniej opublikowanych wynikach badań [Zarychta i in. 2010]. Szybkość fermentacji brzeczek kontrolnych (12%) z udziałem tych szczepów była analogiczna jak pozostałych dwóch szczepów: *S. carlsbergensis I-S.ca./37* oraz *S. cerevisiae I-S.c./51*. Natomiast w warunkach ekstremalnego zagęszczenia brzeczki (20%) szczepy I-S.ca./13 oraz I-S.c./57 wykazały lepszą dynamikę fermentacji i wyższe odfermentowanie. W badaniach wykorzystano dwa hydrolizaty skrobiowe charakteryzujące się zróżnicowanym profilem węglowodanowym: syrop G o wysokiej zawartości glukozy oraz syrop M o wysokiej zawartości maltozy.

Aktywność drożdży piwowarskich jest szczególnie ważna w procesach typu HGB i VHGB, w których po odfermentowaniu zatężonych brzeczek i leżakowaniu piwa nastę-

puje jego rozcieńczanie do pożądanego ekstraktu [Andersson i Norman 1997, Koukol 1997]. Niezwykle istotny jest stopień zatężenia brzeczki. Im wyższe stężenie ekstraktu w brzeczce, tym odfermentowanie słabsze. Zostało to stwierdzone zarówno przez Almeida i in. [2000], jak i w niniejszej pracy. Wraz ze wzrostem zawartości ekstraktu w brzeczce zwiększała się ilość wydzielanego etanolu, jednak stopień odfermentowania pogarszał się, zwłaszcza w fermentacjach prowadzonych przez szczep I-S.ca./13. Zbyt słaba aktywność fermentacyjna drożdży powoduje pozostawienie dużej ilości składników ekstraktu, co może prowadzić do niekorzystnych zmian organoleptycznych w gotowym piwie [Dietvorst i in. 2005, Ernandes i in. 1993, Jespersen i in. 1999, Vidgren i in. 2005].

W fermentacjach powtórzeniowych stopień odfermentowania ekstraktu zmniejszał się z kolejnym cyklem, niezależnie od stężenia i rodzaju dodanego do brzeczki hydrolizatu. Szczególnie było to widoczne w przypadku drożdży dolnej fermentacji – tworzyły one mniejszą ilość etanolu. U drożdży górnej fermentacji stwierdzono analogiczną tendencję, jednak stopień odfermentowania i zawartość etanolu były jedynie nieznacznie mniejsze niż w I cyklu.

Dane wskazują, że do fermentacji brzeczek zatężonych dodatkiem hydrolizatów do 16% korzystniejszy jest wybór drożdży górnej fermentacji. Szczep I-S.c./57, niezależnie od stężenia i składu cukrów w medium, był bardziej aktywny niż szczep dolnej fermentacji (I-S.ca./13). Wykazywał lepszy stopień odfermentowania i produkował większą ilość etanolu. Badania Pratt i in. [2003] wykazały, że w warunkach kontrolowanego *in vitro* stresu osmotycznego i etanolowego drożdże fermentacji górnej, pomimo widocznych pod mikroskopem zmian morfologicznych, zachowały dobrą żywotność, podczas gdy udział nieaktywnych komórek drożdży fermentacji dolnej zwiększał się wraz z postępującym czasem inkubacji. Większa odporność szczepów fermentacji górnej na podwyższone ciśnienie osmotyczne lub wysoką zawartość etanolu związana jest z ich optymalną temperaturą wzrostu i fermentacji. Fermentacja przy udziale drożdży górnej fermentacji prowadzona jest w temperaturze około 20˚C. Aktywizuje to komórki do przyspieszenia transportu cukru [Verstrepen i in. 2003] i szybkiej jego utylizacji, co skutkuje lepszą dynamiką procesu.

Z zaprezentowanych danych wynika, że hydrolizaty skrobiowe stanowią dobry składnik medium fermentacyjnego dla drożdży wykorzystywanych wielokrotnie, zwłaszcza jeżeli zawartość ekstraktu w brzeczce nie przekracza 16%. Wybór hydrolizatu dodawanego do brzeczki powinien głównie uwzględniać możliwość zachowania czystego smaku piwa.

WNIOSKI

1. Niezależnie od stężenia brzeczki, jak i rodzaju hydrolizatu skrobiowego, drożdże fermentacji górnej *S. cerevisiae* I-S.c./57 cechowały się lepszą dynamiką fermentacji w porównaniu ze szczepem fermentacji dolnej *S. carlsbergensis* I-S.ca./13.

2. Badane szczepy drożdży dobrze tolerowały zwiększenie zawartości ekstraktu brzeczek do 16%, także w procesach wielokrotnego zawracania biomasy. Świadczyło o tym utrzymanie dobrej dynamiki fermentacji. Dalsze zwiększanie ilości ekstraktu brzeczek do 20% wywierało negatywny wpływ na dynamikę procesu.

3. Do produkcji piwa z zagęszczonych dodatkiem hydrolizatu skrobiowego brzeczek proponuje się stosowanie drożdży górnej fermentacji, po uprzedniej ocenie ich uzdolnień fermentacyjnych w środowiskach o podwyższonym ciśnieniu osmotycznym.

PIŚMIENNICTWO

Almeida R.B., Almeida e Silva J.B., Lima U.A., Assis A. N., 2000. High-gravity brewing utilizing factorial design, Braz. J. Chem. Eng., 17 (2), 239–244.

Andersson L.E., Norman H., 1997. Water deaeration, blending and carbonation in high gravity brewing. Brauwelt International, 1, 59–61.

Dietvorst J., Londesborough J., Steensma H.Y., 2005. Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTT1 encodes a maltotriose transporter. Yeast 22 (10), 775–788.

Ernandes J.R., Williams J.W., Russell I., Stewart G.G., 1993. Respiratory deficiency in brewing yeast strains – effects on fermentation, flocculation and beer flavor components, J. Am. Soc. Brew. Chem., 51, 16–20.

Jespersen L., Cesar L.B., Meaden P.G., Jakobsen M., 1999. Multiple α-glucoside transporter genes in brewer's yeast. Appl. Environ. Microbiol. 65(2), 450–456.

Koukol R., 1997. High Gravity Brewing. Brauwelt Int., 3, 248–251.

Pratt L.P., Bryce H.J., Stewart G.G., 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. J. Inst. Brew. 109 (3), 218–228.

Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H., Delvaux F.R., 2003. Yeast flocculation: What brewers should know. Appl. Microbiol. Biotechnol., 61, 197–205.

Vidgren V., Ruohonen L., Londesborough J., 2005. Characterization and functional analysis of the *MAL* and *MPH* loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. Appl. Environ. Microbiol., 71, 7846–7857.

Zarychta P., Dziuba E., Chmielewska J., Foszczyńska B., 2010. Dynamika i efekty końcowe fermentacji piwowarskich brzeczek stężonych (HG i VHG). Przem. Ferm. Owoc. Warz., (przyjęta do druku).

DYNAMICS AND EFFECTS OF SERIAL REPITCHING FERMENTATIONS OF WORTS WITH HIGHER EXTRACT CONCENTRATION

Abstract. The impact of serial repitching on dynamics and effects of HG (16%) and VHG (20%) wort fermentations was examined. It was observed that top-fermenting brewing yeasts (*S. cerevisiae* I-S.c./57) had a better fermentation activity than bottom-fermenting strain (*S. carlsbergensis* I-S.ca./13). Yeasts maintained good dynamics during serial repitching fermentations of 16% worts. Increase of wort concentration up to 20% had a negative influence on dynamics and extract attenuation in serial repitching processes.

Key words: brewing yeast, high gravity worts (HG and VHG), serial repitching fermentations

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2010

Do cytowania – For citation: Zarychta P., Dziuba E., Foszczyńska B., Chmielewska J., 2010. Dynamika i efekty końcowe powtórzeniowych fermentacji brzeczek piwowarskich o podwyższonej zawartości ekstraktu. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 9(3), 3–10.

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM *Acta Sci. Pol., Biotechnologia 9(2) 2010, 11-22*

PRZEMIANY ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH W MLEKU KROWIM I KOZIM PODCZAS FERMENTACJI Z UDZIAŁEM RÓŻNYCH KULTUR KEFIROWYCH

Anna Grzegorczyk, Monika Wszołek
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Streszczenie. Produkcja żywności o najwyższych cechach odżywczych i zdrowotnych, a jednocześnie o jak najlepszych walorach organoleptycznych skłania do podejmowania badań w tym zakresie. Odpowiedni poziom degradacji białek i ich przemiany stają się kluczowym i niezbędnym warunkiem korzystnego oddziaływania na zdrowie konsumentów. Celem pracy było zbadanie, jaki wpływ na przemiany związków azotowych ma rodzaj użytego mleka: krowiego i koziego oraz rodzaj zastosowanej startowej kultury kefirowej. Wyprodukowano sześć różnych rodzajów kefirów, trzy na mleku krowim z zastosowaniem szczepionek DVS Wisby, DVS Biolacta oraz ziaren kefirowych i trzy z tymi samymi kulturami na mleku kozim. Wyprodukowane napoje poddano ocenie organoleptycznej, oznaczono kwasowość czynną, potencjalną, określono zawartość diacetylu i aldehydu octowego, dokonano chromatograficznego rozdziału białek metodą HPLC i przeprowadzono analizę tekstury. Wyniki rozdziału chromatograficznego HPLC frakcji białkowych mleka krowiego i koziego wyraźnie wskazują, że przeprowadzony proces fermentacji mleka kulturami kefirowymi przyczynił się do szeregu zmian proteolitycznych w badanych napojach. Uzyskane wyniki wskazują, że przemiany degradacyjne zależą w zdecydowanie większym stopniu od rodzaju użytego mleka niż zastosowanej szczepionki. Mleko kozie okazało się bardziej podatne na procesy proteolizy w porównaniu z mlekiem krowim, a szczepionką o największych zdolnościach degradacyjnych były ziarna kefirowe.

Słowa kluczowe: mleko kozie i krowie, kefir, związki azotowe, HPLC

WSTĘP

Białka mleka odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu cech smakowych i konsystencji kefiru, zwiększając tym samym uznanie wśród konsumentów. Podczas wyrobu kefiru następują przemiany frakcji białkowych, szczególnie na etapie dojrzewania kefiru [Żbikowska i Żbikowski 1995].

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anna Grzegorczyk, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, e-mail; anna.grzegorczyk@op.pl

Dokładane badania poszczególnych frakcji kazeinowych mleka koziego dowiodły, że właściwości fizykochemiczne są zbliżone do analogów mleka krowiego, chociaż mogą się różnić składem aminokwasowym. Rozważając udział procentowy aminokwasów w kazeinie mleka koziego, można zauważyć, że zdecydowanie dominującym aminokwasem jest kwas glutaminowy (w cząsteczce αs – 45, w cząsteczce β – 43, a w cząsteczce κ – 26). Znaczące różnice dotyczą kwasu asparaginowego (4,8–27,3%) i fenyloalaniny (4,6–14,6%). Jeżeli chodzi natomiast o ilość azotu kazeinowego, to zmienia się ona w zależności od stadium laktacji i zawarta jest w granicach od 0,33 do 0,48%, co stanowi od 70 do 80% azotu całkowitego mleka koziego. Poglądy badaczy na zmienność azotu kazeinowego w czasie laktacji są zróżnicowane. Jedni twierdzą, że zawartość azotu kazeinowego rośnie w czasie pierwszych czterech miesięcy laktacji. Inni natomiast donoszą, że ilość azotu kazeinowego początkowo, w okresie od lutego do maja, spada o prawie 30%, a potem rośnie do końca laktacji. Natomiast wszyscy zgodnie twierdzą, że równoległe i przybliżone są zmiany azotu kazeinowego i całkowitego w mleku kozim w czasie laktacji [Kostyra i Kostyra 1996, Szczepanik i Libudzisz 2000].

Enzymy bakterii kwasu mlekowego powodują degradację białek do związków niskocząsteczkowych, co może przyczyniać się do zwiększonej strawności kefiru.

Niepowtarzalność tego produktu związana jest ze składem mikroflory, która tworzy symbiotyczny twór, jakim są ziarna kefirowe wykorzystywane przy produkcji kefiru. W ziarnach kefirowych zidentyfikowano wiele różnych grup drobnoustrojów, w tym paciorkowców i pałeczek mlekowych, bakterii kwasu octowego oraz drożdży. Wymienione mikroorganizmy żyją w ścisłej symbiozie, a produkty ich metabolizmu wzajemnie stymulują się do wzrostu. Kefir jest produktem o walorach odżywczych i dietetycznych, ma ponadto wiele niezwykłych właściwości terapeutycznych, co kwalifikuje go według wielu autorów do grona produktów probiotycznych [Fesak 1996, Molska i Dymerska 1981].

Celem pracy było zbadanie, jaki wpływ na przemiany związków azotowych ma rodzaj użytego mleka: krowiego i koziego oraz rodzaj zastosowanej startowej kultury kefirowej.

MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiło mleko krowie pochodzące od krów rasy nizinna czarno-biała (ncb), hodowanych w stacji Hodowli Odmian w Dziekanowicach i mleko kozie od kóz rasy polska biała uszlachetniona z prywatnej hodowli kóz w Modlnicy koło Krakowa. Mleko bezpośrednio po rannym udoju przewożono w temperaturze otoczenia do laboratorium, gdzie poddawano je analizom chemicznym i dalszemu przetwarzaniu na kefir. Po transporcie mleko filtrowano w celu usunięcia zanieczyszczeń mechanicznych oraz pobierano próbki do analizy chemicznej. Następnie surowiec podgrzewano do temperatury 40°C, odwirowywano i normalizowano do zawartości 3% tłuszczu, po czym mleko podgrzewano do 60°C i homogenizowano pod ciśnieniem 15±5 MPa. Pasteryzację przeprowadzano w temperaturze 90°C przez 5 minut, następnie mleko schładzano, dzielono na trzy części i każdą zaszczepiano jedną z trzech rodzajów kultur, w ilości 2%:

- Z ziaren kefirowych zakwas przygotowano w następujący sposób: 0,5 l mleka pasteryzowano w 95°C przez 30 minut, ochładzano do 21±1°C i dodawano ziarna kefirowe, inkubowano w tej temperaturze do momentu uzyskania skrzepu i przetrzymywano do uzyskania pH= 4,5–4,6 (ok. 24 h), ziarna odcedzano na sterylnym sicie i zalewano świeżym spasteryzowanym i schłodzonym mlekiem, a uzyskany zakwas używano do zaszczepiania mleka.
- Ze szczepionek typu DVS Biolacta- Danisco i DVS Wisby przygotowano odpowiednie rozcieńczenia w peptonie (zgodnie z instrukcją producenta) i nimi zaszczepiano mleko przerobowe. Mleko po dokładnym wymieszaniu z dodaną kulturą rozlewano do sterylnych plastikowych kubków o poj. 200 cm^3 i inkubowano w temperaturze 22°C do uzyskania pH = 4,6. Otrzymane próbki, po wychłodzeniu, poddawano analizie chemicznej.

Przeprowadzono również analizę sensoryczną [Kurpisz 1984] oraz pomiar tekstury. Ocenę tekstury przeprowadzono przy użyciu teksturometru TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Surrey, England), sterowanego programem komputerowym Texture Expert v.1.0.5. Zakres analiz: zawartość suchej masy metodą suszenia, tłuszcz metodą butyrometryczną [PN-ISO 2446:2002], białko metodą Kjeldahla [PN-EN ISO 8968-2:2004], kwasowość czynną i potencjalną [AOAC], chromatograficzny rozdział białek metodą HPLC – w celu wydzielenia tłuszczu próbkę kefiru o masie 15 g odwirowywano (1000xg). Następnie do 2 g przygotowanego napoju dodawano 4 ml eluentu A zawierającego wodę i kwas trifluorooctowy (TFA) w stosunku objętościowym 1000:1 i natychmiast wstrząsano. Po 30 min próbkę ponownie intensywnie mieszano i odwirowywano przez 10 min w wirówce typu MPW- 330 przy obrotach 1000 x g. Supernatant filtrowano przez membranowy filtr strzykawkowy Millex-LCR_{13} firmy Millipore o średnicy 13 mm i rozmiarach porów 0,5 μm, a uzyskany przesącz w ilości 50 μl nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną. Rozdziały przeprowadzono na wysoko sprawnym chromatografie cieczowym (HPLC) LaChrom firmy Merck-Hitachi. Układ wyposażony był w pompę gradientową L-7100, autosampler L-7250, kolumnę oraz detektor diodowy (DAD) L-7450. Poszczególnymi elementami układu sterował komputer poprzez interfejs D-7000, który współpracował z programem HSM. W badaniach zastosowano kolumnę oktadecylosilanową do rozdzielania białek LiChroCART 250-4 WP 300 RP-18 (5 μm) wyposażoną w prekolumnę LiChroCART 4-4. Stosowano niskociśnieniowy gradient o przepływie 1 ml/min i następującym składzie: eluent A– H_2O : TFA= 1000:1, eluent B– H_2O : acetonitryl (ACN) : TFA = 100 : 900 : 0,7. Czasowa zmiana gradientu przedstawiała się następująco: 0–10 min (100% A), 10–110 min (100% A→ 34% A) i 110–120 min (34% A). Rejestrowano chromatogramy DAD w zakresie długości fal od 210 do 300 nm, z których następnie ekstrahowano chromatogram przy λ=220 nm. Dzięki odpowiednio zaprogramowanemu wzorcowi raportów możliwy był pomiar powierzchni pod poszczególnymi pikami, co umożliwiało ilościowe porównanie poszczególnych frakcji w badanych próbkach. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu Statistica 5.0. z uwzględnieniem średnich arytmetycznych i odchyleń standardowych między badanymi parametrami. W celu określenia wpływu rodzaju kultury starterowej i rodzaju mleka na współczynniki jakościowe kefiru zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic między średnimi określono za pomocą testu Duncana.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wskaźniki jakościowe mleka krowiego i koziego

Badania wykazały, że mleko kozie pod względem składu chemicznego podstawowych parametrów odżywczych nie różni się zasadniczo od mleka krowiego. Kwasowość czynna surowca krowiego odznaczała się wyższymi wartościami i wyniosła 6,59, natomiast mleka koziego 6,53. Otrzymane rezultaty różnią się statystycznie istotnie. Również kwasowość potencjalna była wyższa dla mleka krowiego 7,20°SH przy 6,93°SH dla mleka koziego (tab. 1). Dane te zbieżne są z wynikami z literatury, które mówią o tym, że pH mleka koziego jest zmienne w szerokim zakresie i waha się od 6,08 do 7,06, natomiast kwasowość potencjalna od 4,4 °SH do 8,5 °SH [Wszołek 1995].

Wskaźnikami jakościowymi, dla których mleko kozie uzyskało wyższe wartości niż mleko krowie, była sucha masa odpowiednio 11,64 i 11,00% oraz białko 3,42 i 3,33%. W przypadku suchej masy wystąpiły różnice statystycznie istotne. Uzyskane dane mieszczą się w zakresie wyników otrzymanych przez Kudełkę [1997], według której średnia zawartość tłuszczu dla mleka koziego wynosi 3,50%, białka 3,21% i suchej masy 12,06%. Morrisey i Fox cytowani przez Ziajkę [1997] otrzymali dla mleka krowiego 3,70% tłuszczu, 3,40% białka i 12,70% suchej masy i są to wartości minimalnie wyższe od naszych wyników.

Tabela 1. Średnie i odchylenia standardowe dla badanych wskaźników jakościowych mleka krowiego i koziego
Table 1. Average value and standard deviation of milk cow and goat's of quality parameters

Wskaźnik jakościowy Properties of kefir	Mleko krowie Cows' milk x ± s	Mleko kozie Goats' milk x ± s
Kwasowość czynna [pH] Active acidity	$6,59^{x}$±0,02	$6,53^{x}$±0,02
Kwasowość potencjalna [ºSH] Potential acidity	7,20±0,40	6,93±0,25
Gęstość [g·dm^{-3}] Density	1,0280 ±0,00	1,0260±0,00
Tłuszcz [%] Fat	3,37±0,25	3,17±0,15
Sucha masa [%] Dry mass	$11,00^{x}$±0,25	$11,64^{x}$±0,09
Białko [%] Protein	3,33±0,01	3,42±0,02

x – różnice statystycznie istotne

Analiza statystyczna wykazała, że rodzaj mleka nie miał wpływu na kwasowość czynną kefiru. Kefir z zakwasem na ziarnach kefirowych z mleka krowiego uzyskał pH 4,51, zaś z mleka koziego do pH 4,60 (tab. 2). Niższy stopień ukwaszenia uzyskano, stosując szczepionki DVS Wisby i DVS Biolacta, które na mleku krowim obniżyły kwasowość odpowiednio do pH 4,77 i 4,70. Podobną kwasowością czynną cechowały się napoje na mleku kozim, osiągając pH 4,66 dla szczepionki DVS Biolacta i 4,68 dla

DVS Wisby. Przyjmując kwasowość czynną jako wskaźnik jakościowy, można powiedzieć, że pomiędzy napojem wyprodukowanym na grzybkach kefirowych i kefirami powstałymi na szczepionkach Wisby i Biolacta zaobserwowano różnice statystycznie wysoko istotne, natomiast między Biolacta i Wisby różnice statystycznie istotne (tab. 3).

Tabela 2. Wyróżniki jakościowe kefirów (średnie ± odchylenia standardowe)
Table 2. Properties of kefirs (the averages ± the standard deviations)

Wskaźnik jakościowy Properties of kefir	Rodzaj mleka Kind of milk					
	Mleko krowie Cow's milk			Mleko kozie Goat's milk		
	Rodzaj kultury Kind of culture					
	Biolacta	Wisby	Ziarna	Biolacta	Wisby	Ziarna
Kwasowość czynna [pH] Active acidity	4,70 ± 0,02	4,77 ± 0,07	4,51 ± 0,05	4,66 ± 0,00	4,68 ± 0,00	4,60 ± 0,00
Kwasowość potencjalna [°SH] Titration acidity	35,40 ± 3,40	36,20 ± 3,80	39,60 ± 0,40	34,80 ± 0,00	34,40 ± 0,60	35,60 ± 2,40
Aldehyd octowy [mg·dm^{-3}] Acetaldehyde	0,45 ± 0,10	0,27 ± 0,03	2,16 ± 0,50	0,34 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,85 ± 0,35
Diacetyl [mg·dm^{-3}] Diacetyl	0,69 ± 0,15	2,89 ± 0,37	1,25 ± 0,05	0,48 ± 0,03	1,96 ± 0,15	1,20 ± 0,17
Twardość [G] Hardness	27,76 ± 16,22	39,27 ± 29,28	34,48 ± 8,23	11,44 ± 1,46	10,44 ± 0,55	12,25 ± 1,64
Adhezyjność [G·s] Adhesiveness	78,28 ± 70,90	74,45 ± 93,39	162,9± 42,41	-4,19 ± 2,52	-0,31 ± 4,41	0,91 ± 2,31
Gumiastość [G] Guminess	16,11 ± 5,65	23,81 ± 15,62	15,79 ± 3,77	10,64 ± 1,28	10,60 ± 0,33	11,18 ± 1,35
Smak [pkt] Taste [score]	3,85 ± 0,15	3,90 ± 0,10	4,60 ± 0,10	2,85 ± 0,15	2,75 ± 0,75	4,00 ± 0,00
Zapach [pkt] Flavour [score]	3,75 ± 0,25	4,00 ± 0,00	4,75 ± 0,25	3,40 ± 0,10	3,85 ± 0,15	3,35 ± 0,65
Konsystencja Consistency	3,00 ± 0,00	3,75 ± 0,25	3,90 ± 0,60	2,75 ± 0,25	2,25 ± 0,25	2,50 ± 0,60
Wygląd Appearance	3,15 ± 0,15	4,50 ± 0,50	4,25 ± 0,25	2,85 ± 0,15	1,75 ± 0,75	2,00 ± 1,00
Ocena organoleptyczna [pkt] Organoleptic assessment [score]	3,60 ± 0,05	3,94 ± 0,04	4,44 ± 0,06	2,89 ± 0,45	2,66 ± 0,56	3,44 ± 0,26

Tabela 3. Średnie najmniejszych kwadratów dla badanych wskaźników jakościowych kefirów
Table 3. Mean of the least squares of chosen quality parameters of kefirs

Wskaźnik jakościowy Properties of kefir	Rodzaj kultury Kind of culture			Rodzaj mleka Kind of milk	
	Biolacta	Wisby	ziarna	krowie	kozie
Kwasowość czynna [pH] Active acidity	$4{,}68^{aA}$	$4{,}72^{aB}$	$4{,}55^{AB}$	4,66	4,65
Kwasowość potencjalna [ºSH] Titration acidity	35,10	35,30	37,60	37,07	34,96
Aldehyd octowy [mg·dm^{-3}] Acetaldehyde	$0{,}39^{A}$	$0{,}55^{B}$	$1{,}50^{AB}$	$0{,}96^{a}$	$0{,}68^{a}$
Diacetyl [mg·dm^{-3}] Diacetyl	$0{,}58^{AB}$	$2{,}42^{AC}$	$1{,}22^{BC}$	$1{,}61^{A}$	$1{,}21^{A}$
Twardość [G] Hardness	19,60	24,86	23,36	$33{,}84^{A}$	$11{,}38^{A}$
Adhezyjność [G·s] Adhesiveness	-41,23	-37,38	-80,99	$-105{,}21^{A}$	$-1{,}20^{A}$
Gumiastość [G] Guminess	13,38	16,93	13,48	$18{,}57^{a}$	$10{,}63^{a}$
Smak [pkt] Taste [score]	$3{,}35^{A}$	$3{,}33^{B}$	$4{,}30^{AB}$	$4{,}12^{A}$	$3{,}20^{A}$
Zapach [pkt] Flavour [score]	$3{,}58^{a}$	3,93	$4{,}05^{a}$	$4{,}17^{A}$	$3{,}53^{A}$
Konsystencja Consistency	2,88	3,00	3,20	$3{,}55^{A}$	$2{,}50^{A}$
Wygląd Appearance	3,00	3,13	3,13	$3{,}97^{A}$	$2{,}20^{A}$
Ocena organoleptyczna [pkt] Organoleptic assessment [score]	$3{,}24^{A}$	$3{,}30^{B}$	$3{,}94^{AB}$	$3{,}99^{a}$	$2{,}99^{a}$

A, B – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami różnią się statystycznie wysoko istotnie ($p < 0{,}01$)
a, b – wartości średnie oznaczone tymi samymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p < 0{,}05$)

Natomiast na kwasowość potencjalną kefiru nie miał wpływu ani rodzaj mleka, ani też rodzaj szczepionki.

Najważniejszym związkiem lotnym, będącym produktem metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej, jest diacetyl, nadający produktom mleczarskim charakterystyczny orzechowy posmak [Kornacki i in. 1997, PN-ISO 2446:2002]. Dobry aromat uzyskuje się w obecności 2–3 mg·dm^{-3}. natomiast poniżej 1 mg·dm^{-3} aromat jest słaby. Jest on wytwarzany przez paciorkowce aromatyzujące *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp**.** [Molska 1988]. Z przeprowadzonych analiz wynika, że więcej tego związku występuje w kefirach wyprodukowanych na mleku krowim – 1,61 mg·dm^{-3} niż na mleku kozim – 1,21 mg·dm^{-3}. Uzyskane zależności wynikają najprawdopodobniej z niższej zawartości cytrynianów w mleku kozim [Szczepanik i Libudzisz 2000].

Rozpatrując wpływ rodzaju kultury na zawartość diacetylu, można zauważyć, że szczepionką najbardziej uzdolnioną do produkcji tego związku jest DVS Wisby, która w kefirze z mleka krowiego wytworzyła 2,89 mg·dm^{-3}, zaś z mleka koziego 1,96 mg·dm^{-3}. Połowę mniej diacetylu uzyskano w kefirach na zakwasie z ziaren kefirowych, i tak z mleka krowiego 1,25 mg·dm^{-3}, zaś koziego 1,20 mg·dm^{-3}. Najmniejszą ilość

stwierdzono natomiast w kefirach wyprodukowanych z udziałem DVS Biolacta, i to zarówno w mleku krowim – 0,69 mg·dm^{-3}, jak i kozim – 0,48 mg·dm^{-3} (tab. 2). Tak niski wynik z jednej strony może świadczyć o niewielkich zdolnościach aromatotwórczych tej szczepionki, z drugiej zaś można przepuszczać, że część diacetylu została enzymatycznie zredukowana do 2,3-butylenoglikolu [Molska i Dymerska 1988]. Pomiędzy badanymi kulturami w tym zakresie występują statystycznie wysoko istotne różnice (tab. 3).

Rozdział białek mleka i kefirów metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC

Rozdzielone substancje pogrupowano w zależności od czasu ich retencji, czyli na podstawie ich mas cząsteczkowych i hydrofobowości. Pierwszą grupę związków o czasie retencji do 8 minut stanowiły aminokwasy i inne substancje niskocząsteczkowe. Drugą grupę – peptydy i białka rozpuszczalne w 10% TCA o czasie retencji od 8 do 73 minut i masie cząsteczkowej mniejszej od 3 000 Da [Kaiser i in. 1992]. Następna grupa związków to peptydy i białka nierozpuszczalne w 10% TCA o masie cząsteczkowej powyżej 3 000 Da. Grupę peptydów i białek rozpuszczalnych w 10% TCA podzielono na hydrofilowe i hydrofobowe, zróżnicowane czasem retencji.

Przemiany degradacyjne związków azotowych można zaobserwować na podstawie wyników rozdziału białek mleka i kefirów wykonanych metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Dzięki odpowiednio zaprogramowanemu wzorcowi raportów możliwy był pomiar powierzchni pod poszczególnymi pikami, co umożliwiało ilościowe porównanie poszczególnych frakcji w badanych próbkach.

Analiza wykazała, że proces fermentacji kultur kefirowych przyczynił się do znacznego wzrostu liczby pików i obniżenia sumy ich powierzchni, które dla mleka krowiego wynoszą 50 i 47,43·10^6, natomiast dla kefirów z tego surowca odpowiednio DVS Biolacta 88 i 10,84·10^6, grzybki kefirowe 84 i 11,06·10^6, DVS Wisby 97 i 18,39·10^6. W mleku kozim stwierdzono 38 pików i sumę powierzchni pól 42,64·10^6, a kefiry wyprodukowane z tego surowca i szczepionki Biolacta 76 i 11,54·10^6, zaś w tych wyprodukowanych z użyciem zakwasu z ziaren kefirowych 75 i 9,77·10^6 oraz 85 i 13,46·10^6 przez DVS Wisby (tab. 4).

Kolejnym wskaźnikiem, który pokazuje proteolityczne właściwości fermentacji kultur kefirowych, jest liczba pików dla aminokwasów i innych substancji niskocząsteczkowych oraz procent powierzchni odpowiadający tym związkom. Dla mleka krowiego wskaźniki te mają wartość 9 i 7,46%, zaś dla analizowanych napojów 9 i 39,61% dla DVS Biolacta, 9 i 39,06% dla ziaren kefirowych, 13 i 60,99% dla DVS Wisby. W mleku kozim oznaczono 8 pików odpowiadających aminokwasom i związkom niskocząsteczkowym i 7,49% powierzchni tych pików, zaś dla kefirów z tego surowca dla DVS Biolacta odpowiednio 9 i 41,48%, zakwasu ziaren kefirowych 9 i 50,04% oraz dla szczepionki Wisby 8 i 35,42%.

Liczba pików charakteryzująca peptydy niskocząsteczkowe, czyli mniejsze od 3 000 Da i procentowy udział powierzchni im odpowiadający jest zdecydowanie mniejszy w mleku krowim 21 i 2,64%, w porównaniu z zawartością znajdującą się w kefirach ze szczepionki Biolacta 74 i 38,26%, ziaren kefirowych 69 i 26,57%, Wisby 69 i 26,57%. Identyczną zależność odnajdujemy w surowcu kozim, w którym stwierdzono 18 pików i 3,39% i również nastąpiło zwiększenie udziału tych frakcji w napojach ze szczepionki Biolacta 49 i 42,85%, z ziaren kefirowych 61 i 35% i Wisby 54 i 42,16%.

Tabela 4. Analiza rozkładu białek mleka i kefirów metodą HPLC
Table 4. Analysis schedule milk and kefir protein by method HPLC

Nazwa próbki Name of sample	Liczba pików Number of peaks	Suma powierzchni pól pików The sum total of surface the field of peaks	Liczba pików dla aminokwasów i innych substancji niskocząsteczkowych (0–8 min) Number of peaks for aminoacids and different low molecular substances (0–8 min.)	% powierzchni pików odpowiadający aminokwasom i innym substancjom niskocząsteczkowym (0–8 min) % the surface of peaks answering the amino acids and different low molecular substances (0–8 min.)	Liczba pików peptydów i białek rozpuszczalnych w 10% TCA (8–73 min) Number of peaks of peptides and solvable proteins in 10% TCA (8–73 min.)	% powierzchni pików odpowiadający peptydom i białkom rozpuszczalnym w 10% TCA 3 000 Da (8–73 min) % the surface of peaks answering the peptides and solvable proteins in 10% TCA < 3 000 Da (8–73 min.)	Liczba peptydów i białek nierozpuszczalnych w 10% TCA (73–110 min) Number of peptides and indissoluble proteins in 10% TCA (73–110 min.)	% powierzchni pików odpowiadający peptydom i białkom nierozpuszczalnym w 10% TCA >3 000 Da (73–110 min) % the surface of peaks answering the peptides and proteins indissoluble w10 % the TCA > 3 000 Da (73–110 min.)	Stosunek powierzchni pików Relation surface of peaks
K	50	$47{,}43 \cdot 10^6$	9	7,46	21	2,64	17	90,70	34,36
G	38	$42{,}64 \cdot 10^6$	8	7,49	18	3,39	12	89,12	26,30
K–Biolacta	88	$10{,}84 \cdot 10^6$	9	39,61	74	38,26	15	22,13	0,58
G–Biolacta	76	$11{,}54 \cdot 10^6$	9	41,48	49	42,85	18	15,26	0,36
K–Grzybki	84	$11{,}06 \cdot 10^6$	10	39,06	61	35,00	13	25,95	0,74
G–Grzybki	75	$9{,}77 \cdot 10^6$	9	50,04	49	33,90	17	16,06	0,47
K–Wisby	97	$18{,}39 \cdot 10^6$	13	60,99	69	26,57	15	12,44	0,47
G–Wisby	85	$13{,}46 \cdot 10^6$	8	35,42	54	42,16	23	22,38	0,53

Ilość pików odpowiadająca peptydom i białkom nierozpuszczalnym w 10% TCA i procent powierzchni, który jest większy od 3000 Da, w mleku krowim wynosił 17, co stanowiło 90,70% i zmniejszyło się w powstałych napojach do 15 i 22,13% dla kefirów ze szczepionki Biolacta, 13 i 16,06% dla grzybków kefirowych oraz 15 i 12,44% dla DVS Wisby. W surowcu kozim występuje podobna zależność, mianowicie 12 pików peptydów i białek nierozpuszczalnych w 10% TCA, co stanowi 89,12% powierzchni tych związków i odpowiednio dla kefirów z tego surowca następuje spadek i dla szczepionki Biolacta 18 i 15,26%, grzybków kefirowych 17 i 16,06% oraz dla Wisby 23 i 22,38%.

Wymienione wskaźniki zostały ujęte w iloczyn, który pokazuje stosunek powierzchni pików związków, których wielkość przekracza 3000 Da, do powierzchni pików poniżej tej wartości. Dla mleka krowiego stosunek ten wyniósł 34,36, zaś dla kefirów ze szczepionki Biolacta 0,58, grzybków kefirowych osiągnęły 0,74, natomiast Wisby 0,47. W mleku kozim stosunek ten kształtuje się na poziomie 26,30 i dla napojów z tego surowca odpowiednio 0,36 Biolacta, 0,47 grzybki i 0,53 Wisby. Widać wyraźnie, że podczas fermentacji kefirowej nastąpił drastyczny spadek tego stosunku, co świadczy, że związki wielkocząsteczkowe (> 3 000 Da) zostały rozłożone, w rezultacie czego powstała duża ilość peptydów o niskiej masie (< 3 000 Da).

Wykonana analiza chromatograficzna HPLC (tab. 5) ukazuje również rozdział peptydów hydrofilowych i hydrofobowych. Wskaźniki te pomocne są w określeniu mechanizmu wymywania peptydów, który związany jest z kilkoma czynnikami i zmienia się wraz ze wzrastającymi właściwościami hydrofobowymi, długością wiązań i masą molekularną związku. Wartości te interesujące są również z innego powodu, a mianowicie według Ney's [cyt. za PN-EN ISO 8968-2:2004] peptydy o wartości mniejszej od 1 350 cal mol^{-1} nie są gorzkie, podczas gdy peptydy o wartości powyżej 1 350 cal mol^{-1} okazują gorycz, jeżeli masa molekularna jest mniejsza od 6 000 Da [Pijanowski 1984]. Liczba pików peptydów hydrofilowych, których czas retencji zawarty był pomiędzy 8 a 35 minutą oraz procent powierzchni pików odpowiadający tym peptydom, to dla mleka krowiego 12 i 1,84% zaś dla kefirów, które powstały z tego surowca, wskaźniki te wzrastają odpowiednio dla Biolacta 24 i 17,61%, grzybków kefirowych 22 i 17,32% oraz Wisby 21 i 10,87%. Jeżeli chodzi o mleko kozie, to zidentyfikowano 9 pików peptydów hydrofilowych, co stanowi 2,86% i dla napojów kozich: Biolacta 17 i 21,21%, grzybki kefirowe 18 i 17,01% oraz Wisby 18 i 17,59%.

Liczba peptydów hydrofobowych, dla których czas retencji zawarty był między 35 i 73 minutą i procent powierzchni odpowiadający tym peptydom wyniósł dla mleka krowiego 11, co stanowiło 0,63%, zaś dla kefirów z tego surowca: Biolacta 41 i 20,65%, grzybki 39 i 17,68% oraz Wisby 48 i 15,70%. Analiza mleka koziego wykazała 9 pików dla peptydów hydrofobowych i odpowiednio 0,53% powierzchni oraz dla kefirów wyprodukowanych z tego mleka dla szczepionki Biolacta 32 i 21,65%, grzybków 48 i 32,96% oraz Wisby 36 i 24,58%. W tabeli 4 przedstawiono również stosunek powierzchni pików hydrofobowych do hydrofilowych, który dla mleka krowiego wynosi 0,34, zaś dla kefirów wzrasta do 1,17 dla Biolacta, 1,02 dla grzybków i 1,45 dla Wisby. Jeżeli chodzi o mleko kozie, to współczynnik tych zależności jest nieco mniejszy i kształtuje się na poziomie 0,19, zaś dla kefirów z tego surowca Biolacta 1,02, grzybki 1,94 i Wisby 1,40.

Tabela 5. Analiza rozkładu peptydów hydrofilowych i hydrofobowych mleka i kefirów
Table 5. Analysis schedule milk and kefir hydrophilic and hydrophobic peptides

Nazwa próbki Name of sample	Liczba pików peptydów hydrofilowych (8–5 min) Number of peaks of peptides hydrophilic (8–35 min.)	% powierzchni pików odpowiadający peptydom hydrofilowym (8–35 min) % the surface of peaks answering peptides hydrophilic (8–35 min.)	Liczba pików peptydów hydrofobowych (35–73 min) Number of peaks of peptides hydrophobic (35–73 min.)	% powierzchni pików odpowiadający peptydom hydrofobowym (35–73 min) % the surface of peaks answering the hydrophobic peptides (35–73 min.)	Stosunek powierzchni pików hydrofobowych do hydrofilowych Relation of surface of peaks hydrophobic to hydrophilic
K	12	1,84	11	0,63	0,34
G	9	2,86	9	0,53	0,19
K–Biolacta	24	17,61	41	20,65	1,17
G–Biolacta	17	21,21	32	21,65	1,02
K–Ziarna	22	17,32	39	17,68	1,02
G–Ziarna	18	17,01	48	32,96	1,94
K–Wisby	21	10,87	48	15,70	1,45
G–Wisby	18	17,59	36	24,58	1,40

K – mleko krowie – cow's milk
G – mleko kozie – goat's milk

WNIOSKI

1. Rodzaj mleka miał większy wpływ na przemiany związków azotowych niż rodzaj stosowanych kultur
2. Szczepionką o największych zdolnościach proteolitycznych były ziarna kefirowe.
3. Kefiry uzyskane przy zastosowaniu zakwasu z ziaren kefirowych charakteryzowały się lepszymi cechami organoleptycznymi w porównaniu z napojami wyprodukowanymi z udziałem szczepionek DVS.
4. Proces fermentacji mleka kulturami kefirowymi wyraźnie wpłynął na obniżenie zawartości związków wielkocząsteczkowych (>3 000Da) i podwyższenie poziomu związków niskocząsteczkowych (< 3 000 Da) w tych napojach.
5. Podczas fermentacji mleka kulturami kefirowymi nastąpił wzrost udziału peptydów zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych;
6. Skrzep kwasowy z mleka koziego charakteryzował się mniejszą zwięzłością i lepkością.

PIŚMIENNICTWO

AOAC. Official methods of analysis – dairy products. Washington DC 1995.
Fesnak D., 1996. Kefir – nieocenionym produktem w żywieniu człowieka. Przegląd Mleczarski, 9, 296.
Fesnak D., 1996. Kefir – to zdrowie. Przemysł Spożywczy, 10, 24–25.
Kaiser K.P., Belitz H.D., Fritsch R.J., 1992. Monitoring cheedar cheese ripening by chemical indices of proteolysis , Lebens, Unters. Forsch., 195, 8–14.
Kornacki K., Laniewska-Moroz Ł., Warmińska-Radyko I., 1997. Podstawy mikrobiologii mleczarskiej. SP, Warszawa.
Kostyra E., Kostyra H., 1996. Repetytorium z mleka koziego. Część 3. Przegląd Mleczarski, 4, 107–108.
Kudełka W., 1997. Zawartość podstawowych składników mleka koziego w czasie pełnej laktacji. Przegląd Mleczarski, 12, 384–387.
Kurpisz W., 1984. Ocena organoleptyczna produktów mleczarskich. ZWCRS, Warszawa.
Molska I., 1988. Zarys mikrobiologii mleczarskiej. PWRiL, Warszawa.
Molska I., Dymerska B., 1981. Badanie nad zmianami niektórych związków chemicznych w toku przemysłowej produkcji kefiru. Przegląd Mleczarski, 8, 10–13.
Molska I., Gawkowska B., Tarik S.H.Al- Ravi, 1981. Charakterystyka mikroflory ziarn kefirowych. Przegląd Mleczarski, 7.
PN-EN ISO 8968-2:2004, Mleko. Oznaczanie zawartości azotu – Część 2: Metoda z zastosowaniem bloku do mineralizacji (Metoda makro).
PN-ISO 2446:2002. Mleko. Oznaczanie zawartości tłuszczu (metoda rutynowa).
Pijanowski E., 1984. Zarys chemii i technologii mleczarstwa. Tom 1. PWRiL, Warszawa.
Szczepanik A., Libudzisz A., 2000. Wartość dietetyczna mleka koziego. Przemysł Spożywczy, 11, 25–27, 44.
Wszołek M., 1997. Przydatność technologiczna mleka koziego. Przegląd Mleczarski, 1, 12–14.
Wszołek M., Tamine A.Y., Muir D.D., Barclay M.N.I., 2001. Properties of Kefir made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with Different Starter Cultures. Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie, 34 (4), 251–256.
Ziajka S., 1997. Mleczarstwo, zagadnienia wybrane. Tom 1 i 2. ART, Olsztyn.
Żbikowska A., Żbikowski Z., 1995. Znaczenie i właściwości białek w mlecznych napojach fermentowanych. Przegląd Mleczarski, 11, 304–311.

THE TRANSFORMATION OF NITROGENOUS RELATIONSHIP IN THE COW'S MILK AND GOAT'S MILK DURING FERMENTATION WITH PART OF DIFFERENT CULTURES THE KEFIR

Abstract. The production of food with the highest nutritious guilds and the best organoleptic values induces to undertaking in this range the investigations simultaneously. The suitable level of degradation of proteins and their transformations become key the and necessary condition profitable influence on the consumers' health.
The aim of this study was examined influence on transformation of nitrogenous relationships has kind used milk: applied cow's and goat's as well as kind take-off culture.
In this work was produced six different kinds of kefirs, three on cow's milk with use of vaccines Wisby, DVS Biolacta also grains and three with the same cultures on goat's milk.
Fermented drinks gave up organoleptic assessment, marked active and titration acidity, diacetyl, acetaldehyde also used HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and the analysis of texture. The results HPLC of the cow's milk and the goat's they show clearly, that the conducted process of fermentation by kefir cultures milk contributed to saw change in proteolysis in studied drinks. Got results show, that transformation degradation depend in deciding larger degree from kind of used milk than applied vaccine. Goat's milk turned out more susceptible on processes of proteolysis in comparison from cow's milk, and vaccine about the largest abilities degradation were kefirs grains.

Key words: goat's milk and cow, kefir, nitrogenous relationships, HPLC

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2010

Do cytowania – For citation: Grzegorczyk A., Wszołek M., 2010. Przemiany związków azotowych w mleku krowim i kozim podczas fermentacji z udziałem różnych kultur kefirowych. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 9(2), 11–22.

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM *Acta Sci. Pol., Biotechnologia 9(2) 2010, 23-32*

WYSOKOTEMPERATUROWA MODYFIKACJA LIZOZYMU

Grzegorz Leśnierowski, Robert Borowiak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie. Celem niniejszej pracy była próba oligomeryzacji monomeru lizozymu, w wyniku jego wysokotemperaturowej modyfikacji (90–100°C), z użyciem odczynnika RECICLEAN® jako dodatkowego czynnika wspomagającego proces. Modyfikacji poddano wodne roztwory lizozymu o stężeniu 2%. Do tak przygotowanych prób dodawano środek utleniający – odczynnik RECICLEAN® o stężeniu 2%. Proces trwał 20 minut. Uzyskane w wyniku modyfikacji preparaty poddano badaniom analitycznym obejmującym elektroforezę, densytometrię oraz oznaczanie aktywności hydrolitycznej enzymu. W wyniku przeprowadzonej modyfikacji otrzymano preparaty zawierające w swym składzie 73,5–86,8% oligomerów. Nowym jakościowo zjawiskiem było utworzenie się w rezultacie modyfikacji formy tetramerycznej lizozymu, której nie obserwowano dotąd w tego typu modyfikacjach. Ilość powstałych oligomerów zależała od temperatury prowadzenia procesu. Za najbardziej korzystną ze względu na stopień spolimeryzowania oraz ilość aktywnego lizozymu uznano temperaturę 95°C. Uzyskany wówczas preparat zawierał 82,5% oligomerów, w tym 31,7% dimeru, a ilość aktywnego lizozymu zachowała się na poziomie ok. 87%.

Słowa kluczowe: lizozym, modyfikacja wysokotemperaturowa, oligomery, aktywność antybakteryjna

WSTĘP

Lizozym (N-acetylo-muramylohydrolaza E.C.3.2.1.17) jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Stanowi składnik wielu płynów ustrojowych oraz tkanek ludzkich, zwierzęcych i roślinnych. Wyizolowany został także z niektórych bakterii i bakteriofagów. Największą koncentrację enzymu stwierdzono we łzach oraz w białku jaja kurzego, które jest obecnie jego podstawowym źródłem pozyskiwania na skalę przemysłową [Proctor i Cuninngham 1988]. Lizozym jest ważnym czynnikiem chroniącym treść jaja przed drobnoustrojami. Tworzy naturalną ochronę dla rozwijającego się w jaju zarodka. Działanie ochronne enzymu polega na niszczeniu bakterii poprzez roz-

Adres do korespondencji – Corresponding author: Grzegorz Leśnierowski, Katedra Zarządzania Jakością Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, e-mail: boro@up.poznan.pl

puszczanie kompleksu polisacharydowo-peptydowego (peptydoglikanu), z którego zbudowana jest ich ściana komórkowa. Degradacja peptydoglikanu następuje w wyniku hydrolizy wiązania β-1,4-glikozydowego pomiędzy kwasem N-acetylomuraminowym a N-acetyloglukozoaminą [Cuninngham i in. 1991, Leśnierowski i Kijowski 1995]. Właściwości antybakteryjne lizozymu powodują znaczne zainteresowanie jego praktycznym wykorzystaniem. Obecnie enzym jest użytkowany w wielu branżach przemysłu żywnościowego. Stosowany jest jako środek utrwalający podczas przechowywania surowców i produktów spożywczych, wykorzystuje się go do konserwacji mięsa i przetworów mięsnych, ryb i owoców morza, wyrobów garmażeryjnych, serów oraz świeżych owoców i warzyw [Leśnierowski i Kijowski 2007, Leśnierowski 2007, Cegielska-Radziejewska i in. 2008]. Ze względu na swe właściwości lizozym jest również używany w diagnostyce medycznej, farmakologii i weterynarii. Znalazł zastosowanie w terapiach zakażeń wirusowych i bakteryjnych, w leczeniu chorób skórnych, chorób oczu, jamy ustnej, leukemii i chorób nowotworowych, stanowi środek wspomagający działanie antybiotyków [Kijowski i Leśnierowski 1995, Leśnierowski i Kijowski 1995, Leśnierowski 2007].

W warunkach naturalnych lizozym występuje głównie jako monomer i w takiej formie jego antybakteryjne działanie ograniczone jest do bakterii Gram-dodatnich [Leśnierowski i Kijowski 1996]. W ściśle określonych warunkach pH, temperatury i stężenia enzym wykazuje zdolność asocjacji prowadzącej do tworzenia się dimeru i wyższych oligomerów [Kijowski i Leśnierowski 2000, Leśnierowski i in. 2009b]. Dowiedziono, że dimer lizozymu wykazuje nową, odmienną od katalitycznej aktywność skierowaną przeciw bakteriom Gram-ujemnym. Jednocześnie nie traci właściwości bakteriobójczych wobec bakterii Gram-dodatnich, nawet pomimo częściowego obniżenia aktywności hydrolitycznej [Jolles i Jolles 1984, Ibrahim i in. 1994, Muraki i in. 1994, Leśnierowski i in. 2009a, Cegielska-Radziejewska 2009b]. Nowa forma zmodyfikowanego lizozymu czyni go bardziej atrakcyjnym środkiem antybakteryjnym i stwarza możliwości lepszego wykorzystania. Stąd duże zainteresowanie modyfikacjami lizozymu, mającymi na celu uzyskanie jego oligomerycznych form o poszerzonym spektrum działania.

Badania nad modyfikacją lizozymu prowadzone są zaledwie w kilku ośrodkach badawczych na świecie, w tym w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Zakres prowadzonych badań dotyczy przede wszystkim opracowania metod modyfikacji, w wyniku których będzie można otrzymywać preparaty zawierające w swym składzie jak największą liczbę form oligomerycznych enzymu. Jak dotąd nie uzyskano preparatów zawierających 100% oligomerów, a zawartość dimeru zwykle nie przekraczała 50%. Wśród znanych metod modyfikacji enzymu takie efekty jego oligomeryzacji uzyskano metodami chemicznymi [Ibrahim 1994], termicznymi [Leśnierowski i in. 2001, 2004] oraz termiczno-chemicznymi [Cegielska-Radziejewska 2009a, Leśnierowski 2009].

Celem niniejszej pracy była próba uzyskania bogatego w oligomery preparatu lizozymu na drodze termiczno-chemicznej w wyniku jednoczesnego zastosowania wysokiej temperatury (90–100°C) i silnego czynnika utleniającego. Jako substancję utleniającą zastosowano preparat o nazwie handlowej RECICLEAN® holenderskiej firmy Kemira Chemicals BV, którego składnikami aktywnymi są kwas nadmrówkowy i nadtlenek wodoru.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowił monomer lizozymu pochodzący z białka jaja kurzego, uzyskany w warunkach przemysłowych przez firmę Belovo (Belgia) o aktywności hydrolitycznej równej 21252 U/mg.

Modyfikacja lizozymu polegała na przygotowaniu wodnych roztworów enzymu o stężeniu 2% (m/v), których pH ustalano na poziomie 4,0±0,1 i dodaniu odczynnika RECICLEAN® w ilości 2% (v/v). Główny proces modyfikacji prowadzono 20 min w reaktorze analitycznym Synacore Analyst firmy Büchi, odpowiednio w temperaturze 90, 95 i 100°C. Po zakończonej modyfikacji badane próby natychmiast schładzano do temperatury 1–2°C, a następnie zamrażano i suszono liofilizacyjnie przy użyciu liofilizatora GT3 firmy LEYBOLD-HAREUS. Tak przygotowane próby poddano badaniom analitycznym.

Analizę elektroforetyczną (SDS-PAGE) wykonano według metody Leśnierowskiego [2007] z użyciem aparatu SE-600 firmy Hoefer Scientific Instruments (USA). Badane próby nanoszono na żel w ilości 15 µl. Elektroforezę prowadzono w żelu poliakrylamidowym o stężeniu 6% (żel zagęszczający) oraz 12,5% (żel rozdzielający). Natężenie prądu wynosiło 60 mA (żel zagęszczający) oraz 90 mA (żel rozdzielający). Po zakończonym rozdziale frakcji białkowych żel utrwalano przez 60 min w roztworze utrwalającym (kwas octowy, metanol i woda w stosunku 1:5:4), a następnie barwiono przez 24 godziny w 10% roztworze kwasu octowego z dodatkiem błękitu Coomasie Brillant R-250. Do odbarwienia żelu użyto 10% kwasu octowego. Wybarwione żele skanowano i przechowywano jako pliki komputerowe. Określenie ilościowego udziału poszczególnych form polimerycznych lizozymu w badanych preparatach przeprowadzono densytometrycznie z wykorzystaniem programu komputerowego TotalLab TL 100 firmy Nonlinear Dynamics Ltd (USA).

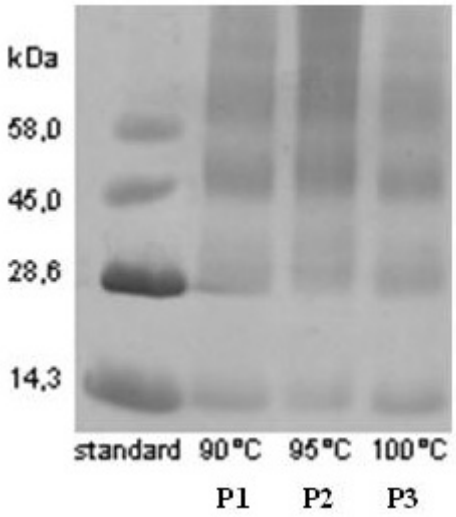
Aktywność hydrolityczną lizozymu oznaczono metodą spektrofotometryczną [Leśnierowski i Kijowski 1995] przy wykorzystaniu zjawiska obniżania zmętnienia zawiesiny bakteryjnej *Micrococcus lysodeikticus* pod wpływem dodanego enzymu. W badaniach wykorzystano spektrofotometr Stv VSU-28 firmy Carl Zeiss Jena. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm, w temperaturze 21°C.

Analizę statystyczną wyników badań wykonano przy użyciu programu STATISTICA PL v.8.0. Wykonano podstawowe obliczenia statystyczne dla każdej zmiennej, wyznaczając m.in. wartość średnią, minimum i maksimum, odchylenie standardowe, błąd standardowy i przedział ufności. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz metody korelacji i regresji.

WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku dotychczasowych badań dotyczących termicznej modyfikacji lizozymu uzyskano preparaty zawierające do 30% dimeru [Leśnierowski i in. 2001, 2004]. Zastosowanie metody termiczno-chemicznej z utlenianiem enzymu spowodowało wzrost ilości dimeru w preparacie do poziomu 35–40% oraz pojawienie się w nim trimeru w ilości 10–12%. Najlepsze efekty modyfikacji uzyskiwano przy zastosowaniu temperatury 60–70°C i nadtlenku wodoru jako substancji utleniającej [Leśnierowski 2007, 2009]. Kolejne badania z tego obszaru, przedstawione w niniejszej pracy, były próbą dalszej intensyfikacji oligomeryzacji enzymu. Ich bezpośrednim celem było sprawdzenie

efektu modyfikacji lizozymu w jeszcze wyższej, krytycznej dla tego enzymu temperaturze, tj. 90–100°C z udziałem silnego środka utleniającego jako substancji wspomagającej proces. Modyfikacje te prowadzono w reaktorze analitycznym Synacore Analyst firmy Büchi a jako środek utleniający wykorzystano preparat firmy Kemira Chemicals BV o nazwie handlowej RECICLEAN®, który, oprócz składników utleniających (perhydrol i kwas nadmrówkowy), zawiera w swym składzie także substancje stabilizujące.



Rys. 1. Obraz elektroforetyczny preparatów lizozymu otrzymanych w wyniku jego modyfikacji w krytycznych warunkach temperatury i przy użyciu odczynnika RECICLEAN® jako czynnika wspomagającego oligomeryzację

Fig. 1. Electrophoretic image of lysozyme samples obtained by modification in critical conditions of temperature with the use of RECICLEAN® reagent as an oligomerization-supporting agent

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano preparaty zróżnicowane pod względem jakościowym w zależności od warunków zastosowanych w procesie modyfikacji lizozymu. Badania wykazały, że wykorzystanie odczynnika RECICLEAN® jako czynnika wspomagającego proces w połączeniu z zastosowaniem krytycznych warunków temperaturowych przyniosło spodziewany efekt oligomeryzacji enzymu (rys. 1). Okazało się, że zawartość oligomerów w preparacie uzależniona była od warunków modyfikacji, a przede wszystkim od temperatury prowadzenia procesu. Świadczy o tym zmiana intensywności pasm białkowych w żelu poliakrylamidowym dla kolejno zastosowanych temperatur. Średni udział oligomerów lizozymu w preparatach otrzymanych w odpowiedniej temperaturze ilustruje tabela 1.

Wyniki analizy statystycznej potwierdziły, że na ilość i jakość utworzonych oligomerów podstawowy wpływ miała temperatura, w jakiej prowadzono modyfikację enzymu. Zastosowanie warunków znacznie przekraczających temperaturę jego koagulacji spowodowało intensywny proces oligomeryzacji enzymu. W efekcie otrzymano dimer, trimer, a także tetrametr lizozymu, co było zjawiskiem całkowicie nowym, dotąd nie odnotowanym. Wykazano, że stopniowy wzrost temperatury modyfikacji powodował zwiększenie udziału każdej z form oligomerycznych enzymu. Ostatecznie spolimeryzowano ponad 85% monomeru lizozymu, tj. zdecydowanie więcej niż w dotych-

czasowych modyfikacjach termicznych i termiczno-chemicznych [Leśnierowski 2007, 2009]. W warunkach prowadzenia doświadczenia największą ilość oligomerów otrzymano w temperaturze 100°C. Jednak w tym wypadku obserwowano znaczne obniżenie aktywności hydrolitycznej lizozymu (tab. 2), które było wynikiem działania wysokiej temperatury oraz czynnika modyfikującego (odczynnik RECICLEAN®). Oddziaływania te powodowały znaczne zmiany w strukturze łańcucha polipeptydowego prowadzące do rozfałdowania białka, zwiększenia powierzchni hydrofobowej i postępującego niszczenia centrum aktywnego enzymu.

Tabela 1. Średni udział form oligomerycznych zmodyfikowanego lizozymu w zależności od temperatury procesu
Table 1. Average content of oligomeric forms of modified lysozyme and process temperature

Preparat Preparation	Temperatura Temperature [°C]	Udział dimeru Percentage of dimer [%]	Udział trimeru Percentage of trimer [%]	Udział tetrametru Percentage of tetramer [%]	Suma oligomerów Percentage of oligomers [%]
P 1	90	29,5[a]	25,9[a]	19,8[a]	75,2[a]
P 2	95	31,7[b]	28,9[b]	21,8[b]	82,5[b]
P 3	100	32,8[c]	30[c]	22,6[c]	85,4[c]

A–c – różne litery w kolumnach oznaczają różnicę istotną przy p≤0,05
A–c – different letters in columns denote a significant difference at p≤0,05

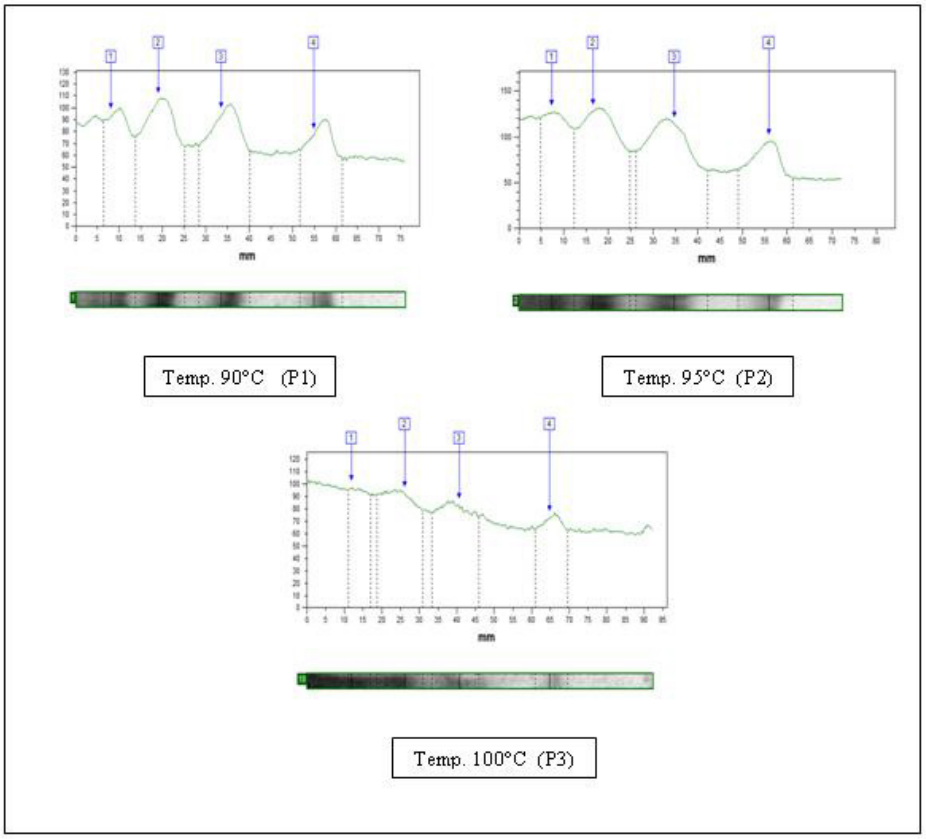
Tabela 2. Zmiany hydrolitycznej aktywności preparatów lizozymu otrzymanych w wyniku wysokotemperaturowej modyfikacji enzymu
Table 2. Changes of the hydrolytic activity of preparations of lysozyme obtained as a result of high-temperature modification of enzyme

Preparat Preparation	Temperatura modyfikacji Temperature of modification	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]	Obniżenie aktywności hydrolitycznej Hydrolytic activity decrease [%]
P 0	monomer	21 252	0
P 1	90°C	3 440	83,8
P 2	95°C	2 799	86,8
P 3	100°C	1 551	92,7

Z zagranicznych danych literaturowych [Ibrahim 1996, Chang i Li 2002, Ibrahim 2003] oraz publikacji własnych [Cegielska-Radziejewska i in. 2003, Leśnierowski i in. 2004] wynika, że redukcja aktywności hydrolitycznej nie wpływała na zmniejszenie antybakteryjnego działania lizozymu, a wręcz przeciwnie – zmodyfikowany enzym oprócz działania na bakterie Gram-dodatnie wykazywał dodatkową aktywność przeciw bakteriom Gram-ujemnym. Takie zjawisko przypisuje się powstawaniu w zmodyfikowanym lizozymie nowej aktywności przeciwbakteryjnej, która nie tylko kompensowała utratę bezpośredniej aktywności hydrolitycznej, lecz także powodowała zdecydowane zwiększenie całkowitej antybakteryjnej aktywności enzymu [Cegielska-Radziejewska

i in. 2009a, b]. Wykazano, że aktywność hydrolityczna zmodyfikowanego lizozymu jest tym niższa, im więcej zawiera on form oligomerycznych i tym wyższa, im więcej jest w nim monomeru. Zatem aktywność hydrolityczna ściśle związana jest z monomerem, natomiast formy oligomeryczne są odpowiedzialne za pojawienie się nowego rodzaju aktywności przeciwbakteryjnej niezależnej od aktywności katalitycznej [Ibrahim 2003]. Podobnego efektu można się również spodziewać dla otrzymanych w wyniku przeprowadzonego doświadczenia preparatów. Jednak w celu jego potwierdzenia należy przeprowadzić badania mikrobiologiczne, których zakres niniejszej pracy nie obejmował, a które będą prowadzone na dalszych etapach badań.

Natomiast przeprowadzone już badania wykazały bardzo istotne zmiany zachodzące w modyfikowanych próbach. Ze wzrostem temperatury modyfikacji obserwowano zmniejszanie się intensywności pasm białkowych na elektroforogramach, czego wynikiem było zmniejszenie się wielkości pików na densytogramach (rys. 2). Występowanie tego zjawiska związane było prawdopodobnie z trwałą, nieodwracalną denaturacją części lizozymu poddanego modyfikacji.



Rys. 2. Rozdziały elektroforetyczne i densytogramy lizozymu zmodyfikowanego w temperaturze 90, 95 i 100°C
1– tetramer, 2 – trimer, 3 – dimer, 4 – monomer

Fig. 2. Electrophoretic separations and densitograms of lysozyme modified at 90, 95 and 100°C
1 – tetramer, 2 – trimer, 3 – dimer, 4 – monomer

Ilość nieodwracalnie zdenaturowanego lizozymu oceniono na podstawie analizy zmian sumy pola powierzchni pików otrzymanych w wyniku badań densytometrycznych, odpowiadających dimerowi, trimerowi i tetrametrowi w zależności od zmian warunków modyfikacji. Dla uproszczenia analizy założono, że suma powierzchni pików dla preparatu P1 (90°C) stanowi 100% ilości aktywnego lizozymu. Okazało się, że im wyższa od 90°C była temperatura modyfikacji, tym mniejsze było pole powierzchni uzyskanych pików, a tym samym mniejsza ilość aktywnego lizozymu (tab. 3). Biorąc pod uwagę powyższe zależności ostatecznie wykazano, że proces modyfikacji lizozymu najlepiej jest prowadzić w temperaturze 95°C, bowiem otrzymane w tych warunkach preparaty zawierały 82,5% oligomerów, w tym 31,7% dimeru, a ilość aktywnego – niezdenaturowanego lizozymu wynosiła ok. 87%. Dalsze podwyższanie temperatury do 100°C prowadziło do tak znacznej nieodwracalnej denaturacji, że ilość aktywnego lizozymu w preparacie (P3) wynosiła zaledwie 38% i mimo bezwzględnie większej zawartości oligomerów wykazywał on bardzo niską katalityczną aktywność przeciwbakteryjną (tab. 2 i 3).

Tabela 3. Ilość aktywnego lizozymu pozostałego w preparatach otrzymanych w wyniku jego wysokotemperaturowej modyfikacji

Table 3. Surface of peaks of the total number of modified oligomers in modified samples and percentage decrease of this surface depending on the modification temperature

Preparat Preparation	Temperatura modyfikacji Temperature of modification	Suma pola powierzchni pików wszystkich oligomerów Toatal surface of peaks of all oligomers (piksele/pixel)	Ilość aktywnego lizozymu Amounts of active lysozyme [%]
P 1	90°C	2 510	100
P 2	95°C	2 180	87
P 3	100°C	954	38

Tabela 4. Porównanie efektu modyfikacji lizozymu metodą wysokotemperaturową z efektami uzyskanymi z zastosowaniem innych metod modyfikacji enzymu [Leśnierowski i in. 2009a]

Table 4. Comparison of high-temperature modification of lysozyme effect and the effects resulting from different methods of the enzyme modification [Leśnierowski et al. 2009a]

Metoda modyfikacji Method of modification	Suma oligomerów Percentage of oligomers [%]	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]
Wysokotemperaturowa (metoda stosowana w pracy) High-temperature (method used in the study)	82,6	2 516
Termiczna Thermal	27,2	11 090
Termiczno-chemiczna Thermochemical	45,1	7 680
Membranowa Membrane	52,1	6 440

Oprócz nowych informacji dotyczących oligomeryzacji lizozymu w krytycznych warunkach temperaturowych – cenną informacją uzyskaną w trakcie badań było wykazanie bardzo wysokiej termostabilności enzymu, o wiele wyższej niż to dotąd stwierdzano. Okazało się, że ogrzewanie enzymu w temperaturze 95°C nawet przez 20 min powodowało tylko niewielkie zmiany denaturacyjne, a dopiero jego dłuższe przetrzymanie w temperaturze 100°C wywołało znaczny spadek aktywności hydrolitycznej.

PODSUMOWANIE

W świetle przedstawionych wyników badań można stwierdzić, że prezentowany w pracy sposób modyfikowania lizozymu daje możliwość jego wydajnej oligomeryzacji. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowana metoda wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu, z użyciem odczynnika RECICLEAN® jako dodatkowego czynnika wspomagającego proces, miała istotny wpływ na efektywność tego procesu. We wszystkich otrzymanych próbach uzyskano frakcje odpowiadające masie cząsteczkowej monomeru, dimeru, trimeru i tetrameru. Uzyskanie tetrameru było zjawiskiem jakościowo nowym, nie opisywanym dotąd w literaturze. Ilość powstałych oligomerów zależała od zastosowanej temperatury modyfikacji. Za najbardziej korzystną, ze względu na stopień spolimeryzowania oraz ilość aktywnego lizozymu, należy uznać temperaturę modyfikacji wynoszącą 95°C. Cenną informacją wynikającą z przeprowadzonych badań było wykazanie bardzo wysokiej termostabilności lizozymu.

Z przedstawionego w tabeli 4 porównania efektów modyfikacji lizozymu uzyskanych różnymi sposobami wynika, że przedstawiona w niniejszej pracy metoda wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu z użyciem odczynnika RECICLEAN® wydaje się być jedną z najkorzystniejszych. W wyniku jej zastosowania otrzymano preparaty zawierające o ok. 55% więcej oligomerów w porównaniu z metodą termiczną, ok. 37% więcej w porównaniu z metodą termiczno-chemiczną i ok. 30% więcej niż w metodzie membranowej.

WNIOSKI

1. Wykazano, że wysokotemperaturowa modyfikacja lizozymu z zastosowaniem odczynnika RECICLEAN® jest skutecznym sposobem oligomeryzacji enzymu.
2. Charakterystycznym efektem modyfikacji było pojawienie się formy tetramerycznej lizozymu nie występującej w preparatach otrzymanych w wyniku innych metod modyfikacji enzymu.
3. Za najbardziej korzystną ze względu na stopień spolimeryzowania oraz ilość aktywnego lizozymu uznano temperaturę modyfikacji na poziomie 95°C.
4. Wykazano bardzo wysoką termostabilność lizozymu.

PIŚMIENNICTWO

Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J., 2003. Antibacterial activity of lysozyme modified by membrane technique. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Sci. Technol., 6(2), 1–6.

Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J., 2008. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations – a review. Pol. J. Food Nutr. Sci, 58(1), 5–10.

Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J., 2009a. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. Eur. Food Res. Technol., 228, 841–845.

Cegielska-Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J., Szablewski T., Zabielski J., 2009b. Effects of treatment with lysozyme and its polymers on the microflora and sensory properties of chilled chicken breast muscles, [in:] B. Vet. I. Pulawy, 53, 455–461.

Chang J.Y., Li L., 2002. The unfolding mechanism and disulfide structures of denatured lysozyme. FEBS Letters, 511, 73–78.

Cuninngham F.E., Proctor V.A. and Goetsch S.I., 1991. Egg-white lysozyme as food preservative. Poult. Sci. J., 47, 142.

Ibrahim H.R., Hatta H., Fujiki M., Kim M., Yamamoto T., 1994. Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perilladehyde. J. Agric. Food Chemistry, 42, 1813–1817.

Ibrahim H.R., Higashiguchi S., Juneja L.R., Kim M., Yamamoto T., Sugimato Y., Aoki T., 1996. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram--positive bacteria through membrane damage mechanism. J. Agric. Food Chemistry, 44, 3799–3806.

Ibrahim H.R., 2003. Hen egg white lysozyme and ovotransferrin: mystery, structural role and antimicrobial function. Proc. of Xth European Symp. on the quality of eggs and egg products. Red. Y. Nys, Saint-Brieuc, France, 350–365.

Jolles P., Jolles J., 1984. What is new in lysozyme research? Mol. Cell. Biochem., 63, 165.

Kijowski J., Leśnierowski G., 1995. Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności w diagnostyce medycznej i farmakologii. Biotechnol., 2, 29, 130–140.

Kijowski J., Leśnierowski G., 2000. Lizozym z białka jaja naturalnym konserwantem żywności. XXXI Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, Poznań, 47–56.

Leśnierowski G., Kijowski J., 1995. Aktywność enzymatyczna lizozymu i jej wykorzystanie do utrwalenia żywności. Przemysł Spożywczy, 4(95), 116–119.

Leśnierowski G., Kijowski J., 1996. Budowa i ogólna charakterystyka lizozymu (muramidazy). Żywność Technologia Jakość, 3(8), 6–13, 29.

Leśnierowski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J., 2001. Antibacterial activity of thermally modified lysozyme. EJPAU, Ser. Food Sci. Technol., 2, 1–9.

Leśnierowski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J., 2004. Thermally and chemical--thermally modified lysozyme and its bacteriostatic activity. World Poult. Sci. J., 60, 303–310.

Leśnierowski G., Kijowski J., 2007. Lysozyme, [in:] Bioactive Egg Compounds. R. Huopalathi, R. Lopez, M. Anton, R. Schade. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 33–42.

Leśnierowski G., 2007. Fizykochemiczne metody modyfikacji i pomiaru aktywności lizozymu. Rozprawy Naukowe, 387. Wyd. Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań, 1–104.

Leśnierowski G., Kijowski J., Cegielska-Radziejewska R., 2009a. Ultrafiltration-modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. Int. J. Food Sci. and Technol., 44, 305–311.

Leśnierowski G., Cegielska-Radziejeska R., Kijowski J., 2009b. An attempt to apply medium pressure liquid chromatography to separate lysozyme oligomers in modified enzyme, [in:] New Concepts in Food Evaluation – pod red. T. Trziszki i M. Oziembłowskiego. Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, 299–304.

Leśnierowski G., 2009. Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. Nauka Przyroda Technologie, 3(4), 1–18.

Muraki M., Jigami Y., Harata K., 1994. Alternation of substrate specificity of human lysozyme by spite-specific intermolecular cross linking. FEBS Letters, 355, 271–275.

Proctor V.A., Cuninngham F.E., 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, CRC Critical Revies in Food Sciences Nutrition, 26(4), 359–395.

HIGH-TEMPERATURE MODIFICATION OF LYSOZYME

Abstract. The aim of the study was to oligomerise monomers of lysozyme by modifying it in high temperature using RECICLEAN® as an agent facilitating the process. Water solutions of 2% lysozyme were prepared for modification. The prepared samples were treated with 2% solution of an oxidating reagent – RECICLEAN®. The duration of the process was 20 minutes. The obtained products were analysed by electrophoresis, densitometry and by determining hydrolytic activity. As a result of the modification, products containing 73.5–86.8% of oligomers were obtained. As far as this type of modification is concerned, formation of lysozyme tetramers was a new phenomenon. The number of created oligomers depends on the temperature applied in the process. The most favourable conditions in the light of the degree of polymerisation and the amount of active lysozyme, were those with temperature of 95°C. The products of this process contained 82.5% of oligomers, including 31.7% of dimers, and the amount of the active enzyme remained at the level of approximately 87%.

Key words: lysozyme, high-temperature modification, oligomers, antibacterial activity

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2010

Do cytowania – For citation: Leśnierowski G., Borowiak R., 2010. Wysokotemperaturowa modyfikacja lizozymu. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 9(2), 23–32.

SPIS TREŚCI
CONTENTS

Paweł Zarychta, Ewelina Dziuba, Barbara Foszczyńska, Joanna Chmielewska
Dynamika i efekty końcowe powtórzeniowych fermentacji brzeczek piwowarskich o podwyższonej zawartości ekstraktu 3
Dynamics and effects of serial repitching fermentations of worts with higher extract concentration

Anna Grzegorczyk, Monika Wszołek
Przemiany związków azotowych w mleku krowim i kozim podczas fermentacji z udziałem różnych kultur kefirowych 11
The transformation of nitrogenous relationship in the cow's milk and goat's milk during fermentation with part of different cultures the kefir

Grzegorz Leśnierowski, Robert Borowiak
Wysokotemperaturowa modyfikacja lizozymu 23
High-temperature modification of lysozyme