

EWA HAJDUK, DARIUSZ PIETRZYKOWSKI

ZMIANY BIAŁEK A DŁUGOTRWAŁE PRZECHOWYWANIE GRASICY

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu długoterminowego przechowywania, a także technologii utrwalania grasicy (zamrażanie oraz składowanie w temperaturze -12 i -30°C i liofilizacja) na jej przydatność jako surowca farmaceutycznego. Oznaczano zmiany ilościowe w obrębie białek rozpuszczalnych i azotu aminowego oraz pH. Stwierdzono, że największe zmiany ilościowe białek rozpuszczalnych miały miejsce w liofilizatach grasicy, a azotu aminowego w gruczole przechowywanym w -12°C . Natomiast zmiany pH we wszystkich badanych wariantach były minimalne. Największą stabilnością charakteryzował się surowiec składowany w temperaturze -30°C .

Wstęp

Grasica jest jednym z podstawowych organów układu immunologicznego. Jej upośledzenie powoduje pogorszenie odporności organizmu, przy czym jego efekty można złagodzić podając pacjentowi środki farmakologiczne produkowane z ekstraktów grasiczych. Farmakologicznie czynnymi, najistotniejszymi związkami zawartymi w grasicy są hormony. Zastosowanie preparatów zawierających te związki ma miejsce w przypadku chorób tkanki łącznej i nerwowej [10]. Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) izolowany z grasic embrionalnych, w których występuje w dużych ilościach ma zastosowanie przy leczeniu takich chorób jak zespół Downa czy porażenie mózgo-
we [3, 13]. Innym interesującym składnikiem tego gruczolu są enzymy: dezaminaza adenozynowa (ADA, E.C. 3.5.4.4.) i fosforylaza nukleozydowa (PNP, E.C. 2.4.2.1.). Badania prowadzone nad tymi związkami pozwoliły ustalić zależność pomiędzy dziedzicznym ich brakiem w organizmie ludzkim, a pojawiającymi się chorobami immunologicznymi [5, 6].

Zawarte w grasicy substancje czynne decydują o wartości biologicznej tego gruczołu i jego przydatności jako surowca dla przemysłu farmaceutycznego. Ze względu na białkowy charakter większości z nich interesujące jest czy długo w warunkach zamrażalniczych zachowują one stabilność, a także czy sposób utrwalania może wpłynąć na przedłużenie okresu przechowywania. Stąd też w pracy porównano efekty składowania grasicy bydłej w temperaturze -12 i -30°C oraz w stanie liofilizowanym określając stopień zmian denaturacyjnych białka. Wyniki przedstawione w pracy stanowią część badań optymalizujących, na przykładzie grasicy, warunki magazynowania ubocznych, niejadalnych surowców przemysłu mięsnego przeznaczonych do produkcji biopreparatów.

Materiał i metody badań

Materiałem doświadczalnym była grasica pochodząca z młodego bydła (wiek do 1,5 roku) rasy czarno-białej. Bezpośrednio po uboju (do 2 godzin) pobrano około 4 kg grasicy, przewieziono do laboratorium i oczyszczono z błon oraz tłuszczu. Następnie podzielono na fragmenty i wymieszano je celem lepszego ujednoczenia próby. Z tak otrzymanego surowca przygotowano trzy części. Pierwszą po rozdrobnieniu ($n = 1,0$ cm) zamrożono w temperaturze -30°C w ciągu 8 godzin, a następnie liofilizowano w liofilizatorze typu OE 950 LABOR MIM w ciągu 48 godzin. Temperatura płyty wynosiła 30°C , a ciśnienie w komorze poniżej $0,5$ mmHg. Liofilizat umieszczono w szczelnych pojemnikach, które przechowywano w lodówce (temp. 4°C) przez 23 miesiące. Pozostały materiał zapakowano do woreczków foliowych i zamrożono w równych częściach w temperaturze -12 i -30°C po czym składowano w tych samych warunkach przez okres 23 miesięcy. Przed przystąpieniem do analiz materiał rozmrażano w kuchni mikrofalowej do uzyskania w centrum termicznym temperatury ok. 0°C , następnie rozdrabniano w wilku laboratoryjnym używając siatki metalowej o średnicy oczek $3,5$ mm. Liofilizaty poddawano rehydratacji dodając wodę dejonizowaną w ilości odpowiadającej wodzie usuniętej w czasie suszenia sublimacyjnego. Rehydratację przeprowadzano w ciągu 8 godzin w temp. 4°C . Badania wykonano na surowcu świeżym oraz bezpośrednio po zamrożeniu i liofilizacji, a następnie w czasie przechowywania w odstępach 2–4 miesięcy.

W badanym materiale oznaczano:

- zawartość białek rozpuszczalnych w ekstraktach otrzymanych przez homogenizację 1 g rozdrobnionej tkanki z 40 cm^3 zimnego $0,2$ M KCl metodą biuretową i wyrażono w g/100 g tkanki [16],
- zawartość azotu aminowego zmodyfikowaną metodą Pope'a-Stevensa i wyrażono w mg/100 g tkanki [4],

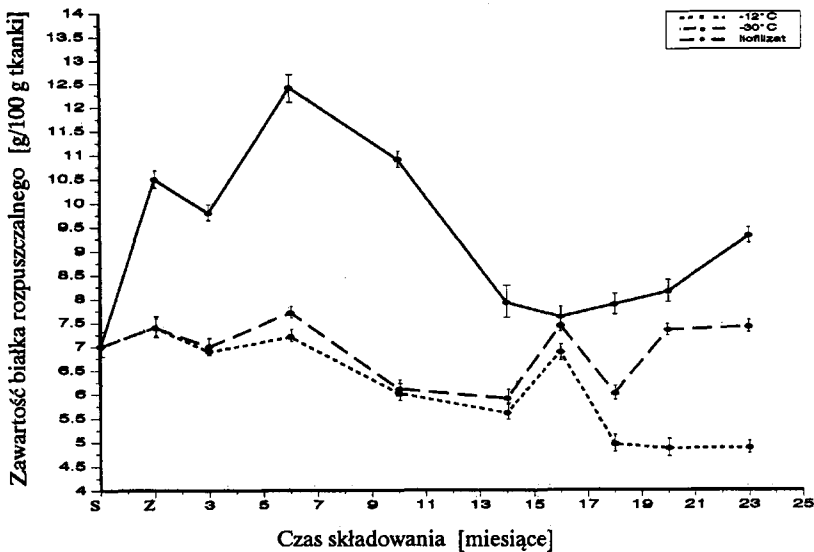
- pH tkanki po jej wymieszaniu z wodą dejonizowaną w stosunku 1:1 stosując pehametr typu HI 9025.

Wyniki poddano statystycznej dwuczynnikowej analizie wariancji stosując program Microsoft Excel 5.0. Średnie z trzech powtórzeń wraz z odchyleniami standardowymi przedstawiono w postaci wykresów.

Wyniki i dyskusja

Zmiany zawartości białek rozpuszczalnych

Zmiany zawartości białek rozpuszczalnych przedstawiono na rys. 1. Największą ilość białek rozpuszczalnych oznaczono w grasicy liofilizowanej, podczas gdy najmniejszą w przechowywanej w temperaturze -12°C , przy czym w tej ostatniej do 18 miesięcy, ich ilość była tylko nieznacznie niższa niż w przechowywanej w -30°C . Ponadto po 23 miesiącach składowania w temperaturze -12°C zaobserwowano spadek rozpuszczalności białek o ok. 30% w porównaniu do grasicy świeżej, natomiast w liofilizatach po tym samym czasie była ona prawie o ten sam procent wyższa. Wykazano statystycznie istotny (przy $p \leq 0,05$) wpływ zarówno metody utrwalania jak i czasu składowania na badany wyróżnik.



Rys. 1. Wpływ czasu składowania i metody utrwalania grasicy bydlęcej na zawartość białek rozpuszczalnych: s – surowiec przed utrwaleniem, z – surowiec bezpośrednio po zamrożeniu lub liofilizacji.

Fig. 1. Effect of storage time and preservation method of bovine thymus on the content of soluble proteins: s – raw material before preservation, z – raw material immediately after freezing or freeze-drying.

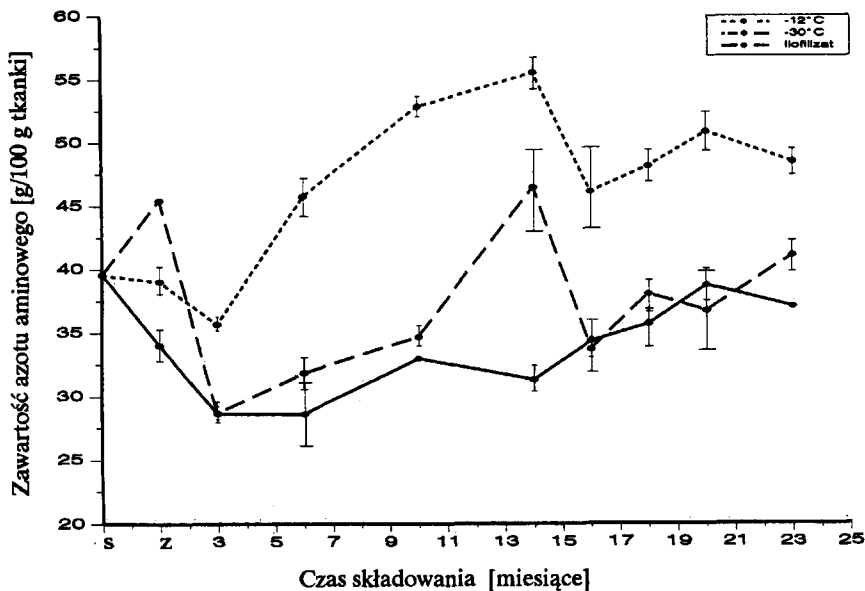
Badanie zmian rozpuszczalności białek pozwala na określenie stopnia ich denaturacji i często służy do oceny efektów działania niskich temperatur. Białka miofibrylarne podatniejsze na denaturację wyraźnie tracą rozpuszczalność podczas przechowywania w temperaturach ujemnych [2, 8, 12, 14, 18].

Niewielkie, w porównaniu z tkanką mięśniową, zmiany zawartości białek rozpuszczalnych grasicy są spowodowane odmienną budową histologiczną oraz składem ilościowym i jakościowym białek, wśród których dominują białka sarkoplazmatyczne i tkanki łącznej charakteryzujące się większą opornością na tego rodzaju zmiany [11].

Większa ilość białek rozpuszczalnych w liofilizatach może być spowodowana zachowaną aktywnością enzymów proteolitycznych, hydrolizujących białka do polipeptydów, dając w efekcie wzrost zawartości białek rozpuszczalnych. W piśmiennictwie można znaleźć dane mówiące zarówno o spadku jak i utrzymaniu aktywności enzymów na niezmienionym poziomie w zliofilizowanym materiale [7, 17].

Zmiany zawartości azotu aminowego

Zmiany zawartości azotu aminowego przedstawiono na rys. 2. Najwyższą jego zawartością charakteryzowała się grasica zamrażana i składowana w -12°C . Średnio w ciągu całego okresu przechowywania była ona większa o ponad 20% w porównaniu z



Rys. 2. Wpływ czasu składowania i metody utrwalania grasicy bydłowej na zawartość azotu aminowego. (s –, z – jak na rys. 1).

Fig. 2. Effect of storage time and preservation method on the amino nitrogen content (s –, z – the same as Fig. 1).

pozostałymi wariantami. Najniższą i najmniej zmienną zawartością azotu aminowego charakteryzował się liofilizat. Większe wahania zaobserwowano w surowcu mrożonym szczególnie w -30°C . W odniesieniu do tego wyróżnika również stwierdzono statystycznie istotny (przy $p \leq 0,05$) wpływ zarówno wariantów utrwalania jak i czasu przechowywania.

Na ogół wzrost zawartości azotu aminowego w tkance spowodowany jest działalnością enzymów proteolitycznych pochodzenia własnego lub mikrobiologicznego. Wyższa temperatura i długi okres przechowywania sprzyja ich działaniu, natomiast krótszy może nie dawać żadnych zmian tego wyróżnika [9, 15].

Porównując ilości białek rozpuszczalnych i azotu aminowego zaobserwowano, iż relacje pomiędzy nimi są wzajemnie przeciwstawne. W obu przypadkach prawdopodobnie odpowiedzialne są enzymy proteolityczne lecz różniące się sposobem działania.

Zmiany pH

Zmiany pH przedstawione zostały w tabeli 1.

Tabela 1

Zmiany pH grasicy przechowywanej w stanie zamrożonym i po liofilizacji.
Changes of pH of frozen and freeze-dried thymus during storage.

Czas składowania (miesiące) Time of storage (months)	Metoda utrwalania / Method of preservation		
	-12°C	-30°C	lioofilizacja / freeze-drying
świeża / fresh	6,63	6,63	6,63
3	6,69	6,67	6,34
6	6,67	6,71	6,53
10	6,62	6,72	5,59
14	6,47	6,78	6,18
16	6,47	6,59	6,15
18	6,52	6,55	6,43
20	6,51	6,68	6,40
23	6,51	6,68	6,36

Wyniki oznaczeń wskazują, że były one minimalne, a spośród trzech metod utrwalania najbardziej zauważalne są w materiale liofilizowanym. Mianowicie, pH liofilizatów w ciągu całego okresu przechowywania było średnio o ok. 0,3 niższe niż w próbach zamrażanych w temperaturze -30°C , a po 23 miesiącach magazynowania kwasowość czynna zmniejszyła się o 0,27 jednostki w porównaniu do surowca świeżego.

Zgodnie z danymi piśmiennictwa zmiany pH mogą przebiegać w różnych kierunkach w zależności od rodzaju składowanego surowca oraz warunków i czasu przechowywania [1, 15].

Podsumowanie

Z uwagi na zwiększoną zawartość azotu aminowego przechowywanie grasicy w temperaturze -12°C jest niekorzystne i nie może być rekomendowane. Podwyższona ilość białek rozpuszczalnych w grasicy liofilizowanej świadczy o hydrolitycznym charakterze zmian zachodzących w białkach gruczołu doświadczonego. Natomiast przechowywanie w -30°C nawet przez okres 23, miesięcy pozwala na zachowanie surowca w stanie najmniej zmienionym.

LITERATURA

- [1] Abdullah M.I., Yu S.Y.: The effect of freezing and frozen storage on the quality of chub mackerel (R. Kanagurta). *FAO FISHERIES-REPORT*, 1985, 317, 230.
- [2] Acton I.C., Saffle R.L.: Preblended and prerigor meat in sausage emulsions. *Food Technol.*, 23(3), 1969, 367.
- [3] Czaplicki J., Błońska B., Pesić M.C., Kalamoniak A., Trzcńska-Fajfrowska M.: An attempt to assess the influence of mature thymic extracts (TFX and THYMEX-L) and DNA on the development of children with psychomotoric retardation. *International Journal of Thymology*, 1(1), 1993, 4.
- [4] Fik M.: Adaptation of Pope Stevens method for rapid assessment of proteolytic enzymes activity and protein hydrolysis intensity in raw materials of marine origin. *Die Nahrung*, 27, 1987, 15.
- [5] Giblett E.R.: Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase deficiency: how they were discovered and what they may mean. *Ciba Foundation Symp.*, 68, 1979, 3.
- [6] Giblett E.R.: ADA and PNP deficiencies: how it all began. *Annals at the New York Academy of Sciences*, 451, 1991, 1.
- [7] Halpern M.G.: *Industrial enzymes from microbial sources*. New Jersey: Noyes Data Corp., 1981, 306.
- [8] Hsu C.K., Kolbe M.T., Morrissey Y.C., Chung Y. C.: Protein denaturation of frozen Pacific whiting (*Merluccius products*) filets. *J. Food Sci.*, 58 (5), 1993, 1055.
- [9] Kijowski J., Niewiarowicz A.: Veraenderungen der Fleischproteine waehrend der Gefrierlagerung bei unterschiedlicher Glykogenolyse post mortem bei Broilern. *Fleischwirtschaft*, 60(6), 1980, 1236.
- [10] Kostkowski W., Kubikowski P.: *Farmakologia - podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej*. PZWL, W-wa, 1996.
- [11] Lim H., Haard N.: Protein insolubilization in frozen halibut. *J. Food Biochemistry*, 8, 1984, 163.
- [12] Miller A.J., Ackerman S.A., Palumbo S.A.: Effects of frozen storage on functionality of meat for processing. *J. Food Sci.*, 45, 1980, 1466.
- [13] Pesić M.C.: Therapeutic possibilities of thymic preparations. *Raum and Zeit*, 1(5), 1989/90, 9.
- [14] Poulter R.G., Lawrie R.A. : Studies on fish muscle protein. Nutritional consequences of the changes occurring during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 1977, 701.
- [15] Smolińska T., Fateh Abdul-Halim: The effects of freezing systems and frozen storage on the quality of broiler tissue muscle. *Archiv. Gefluegelkunde*, 56(2), 1992, 80.
- [16] Snow I.M.: Proteins in fish muscle. II. Colorimetric estimation of fish muscle protein. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 7, 1950, 594.
- [17] Tsvetkov T., Naidenova Z.: Activity of ATP synthetase complex after low temperature treatment or freeze-drying of mitochondria isolated from skeletal muscles. *Cryobiology*, 24, 1987, 280.

- [18] Vidya Dager Reddy G., Srikar L.N.: Preprocessing ice storage effects on functional properties of fish mince protein. *J. Food Sci.*, **56(4)**, 1991, 965.

PROTEIN CHANGES IN LONG-THERM STORED THYMUS

S u m m a r y

The studies were undertaken to evaluate the effect of long-term storage and methods of preservation (freezing and storage at -12 and -30°C and freeze-drying) on the suitability of bovine thymus as a raw material for the pharmaceutical industry. Quantity changes in soluble protein, amino nitrogen and pH were determined. The greatest changes in soluble protein were observed for freeze-dried samples, while for amino nitrogen for gland stored at -12°C. pH changes were insignificant in all analysed methods of storage. Investigations indicated the best stability of the gland stored at -30°C. ☒