

ANNA PIELESZ, WŁODZIMIERZ BINIAŚ, JADWIGA PALUCH

Elektroforeza w octanie celulozy CAE oraz spektroskopia Ramana jako metody identyfikacji β -glukanów składników biologicznie i terapeutycznie aktywnych biomateriałów

Cellulose acetate membrane electrophoresis CAE and Raman spectroscopy
as a method identification of β -glucans, used as biologically
and therapeutically active biomaterials

Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych
Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej

Streszczenie

Wprowadzenie. Glikacja białek tj. nieenzymatyczna reakcja przyłączania cukru do grupy aminowej białka z udziałem polisacharydów (np. β -glukany), tzw. reakcja Maillarda zachodzi w zdrowym i chorym organizmie, a także w warunkach *in vitro* w produktach biomedycznych i spożywczych. W trakcie hydrolizy kwaśnej β -glukany ulegają konwersji do 5-hydroxymetylfurfuralu, jednego z produktów glikacji. Hydrolizaty oznaczano metodami spektroskopii Ramana oraz elektroforezy w octanie celulozy.

Cel pracy. Celem niniejszej pracy było poszukiwanie β -glukanów w powszechnie dostępnych produktach spożywczych, znajdujących także zastosowanie medyczne i farmaceutyczne jako tzw. opatrunki aktywne.

Materiał i metody. Obiektem badań były następujące produkty: ziarna owsa, płatki owsiane, drożdże spożywcze, grzyby (bocznik, pieczarka, suszone podgrzybki i maślaki). Jako wzorca β -glukanów użyto suplement diety β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-glukan. Próbkę o masie 0,2 g umieszczono w temp. ok. 0°C i poddano hydrolizie w 80% H₂SO₄ przez 30 minut. Hydrolizat rozcieńczono do 5 cm³ w wodzie destylowanej. Elektroforezę prowadzono, jak opisano w poprzedniej publikacji [1] w roztworze 0,2 M octanu wapnia (pH=7,5) przez 1,5 godziny w układzie elektrolitycznym CAE (CA-SYSMINI Cellulose Acetate Systems). Warunki pomiaru: 10 mA, max 240 V, 50 W. Następnie wybarwiono płytki w 0,5% roztworze błękitu toluidyny, opłukano w wodzie destylowanej i wysuszono na powietrzu.

Widma Ramana roztworów hydrolizatów rejestrowano przy użyciu spektrometru MAGNA-IR 860 z przystawką FT-Raman. Próbkę wzbudzano laserem o długości 1064 nm (model T10-8S Nd YAG laser). Warunki pomiaru: rozdzielczość – 4 cm⁻¹, zakres pomiarowy 100–4000 cm⁻¹.

Wyniki i wnioski. Glikacja białek z udziałem polisacharydów, tzw. reakcja Maillarda jest wieloetapowym zjawiskiem zachodzącym w zdrowym i chorym organizmie (choroby degeneracyjne), a także w warunkach *in vitro* w produktach biomedycznych i spożywczych.

W trakcie hydrolizy kwaśnej cukrów, heksozy ulegają konwersji i dochodzi do powstania 5-hydroxymetylfurfuralu, jednego z barwnych produktów reakcji Maillarda.

β -glukany identyfikowano po przeprowadzeniu wcześniejszej hydrolizy kwaśnej w 80% kwasie siarkowym (VI). Na podstawie analizy produktów reakcji Maillarda stwierdzono obecność β -glukanów w następujących produktach: ziarna owsa, płatki owsiane, drożdże spożywcze i grzyby (np. bocznik, pieczarka, suszone podgrzybki).

Hydrolizaty oznaczano metodami spektroskopii Ramana oraz elektroforezy w octanie celulozy, co stanowi przykład taksonomicznej klasyfikacji i detekcji dyskutowanych produktów (**Polim. Med. 2012, 42, 1, 69–77**).

Słowa kluczowe: spektroskopia Ramana, elektroforeza w octanie celulozy, β -glukany, glikacja białek, reakcja Maillarda.

Summary

Background. The formation of AGEs progressively increases with normal aging, even in the absence of disease (the pathogenesis of diabetes associated vascular disorders and neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease). However, they are formed at accelerated rates in age-related diseases. The polysaccharides might play a role in wound healing, both internally and externally, and also that they could play a role against inflammation and may lead to the production of better medicines to be used as supplements in cancer treatment.

Objectives. The acid hydrolysis was studied with H_2SO_4 at 80% concentration to determine the most effective procedure for total hydrolysis of β -glucan. The standard of β -glucans acid hydrolysate were compared for commercial oat and oatmeal, mushrooms: *Pleurotus ostreatus*, *Fungus* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Material and Methods. The following materials and reagents were used in the examination: reference β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-glucan, oat and oatmeal, mushrooms: *Pleurotus ostreatus*, *Fungus* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The Raman spectra of the sample solutions (β -glucan acid hydrolysates) were recorded on a MAGNA-IR 860 with FT-Raman accessory. Sample was irradiated with a 1064 nm line of the T10-8S Nd spectra-physics model: YAG laser and scattered radiation were collected at 180°, using 4 cm^{-1} resolution.

The polysaccharide was hydrolyzed into component monosaccharides with 80% H_2SO_4 at 0°C for 30 minutes and monosaccharide derivatives were subjected to electrophoresis, as in a earlier authors study, on a strip of cellulose acetate membrane (CA-SYS-MINI Cellulose Acetate Systems) in 0.2 M $Ca(OAc)_2$ (pH 7.5) at 10 mA, max. 240 V for 1.5 h. The strips were stained with 0.5% toluidine blue in 3% HOAc solution and then rinsed in distilled water and air-dried [1].

Results and conclusions. A part of the hexoses (for example glucose) are converted, to products such as 5-hydroxymethylfurfural. Various coloured substances, through the Maillard reaction have been reported for saccharides. The resulting mono- and oligosaccharides were analysed by cellulose acetate membrane electrophoresis CAE and Raman spectroscopy.

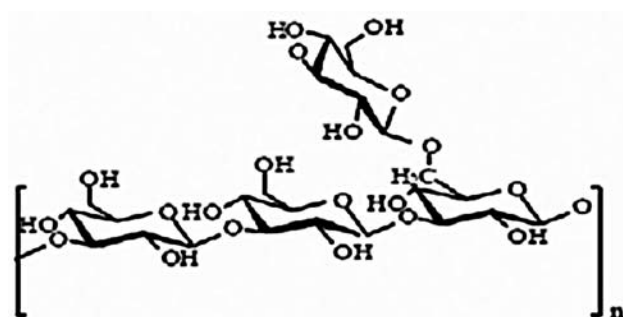
Individual bands or CAE spots were selected to monitor the sugar content in medical plant cell walls and to confirm the identity of the analysed sample: oat and oatmeal, mushrooms: *Pleurotus ostreatus*, *Fungus* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The possibility of a taxonomic classification of products rich in cell-wall materials based on cellulose acetate membrane electrophoresis CAE and Raman spectroscopy for authentication and detection of adulteration of products are discussed (**Polim. Med.** 2012, 42, 1, 69–77).

Key words: Raman spectroscopy, cellulose acetate membrane electrophoresis, β -glucans, the Maillard reaction.

Wprowadzenie

Beta-glukany są typowymi polisacharydami występującymi w ścianach komórkowych [2–8] wielu zbóż, grzybów, drożdży a także ziół, alg i niektórych traw (np. opuncji, porostu islandzkiego). Występujące np. w ścianie komórkowej drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) glukany są polimerami D-glukozy, zbudowanymi z rdzenia glukozowego połączonego wiązaniami β -1,3, od którego odchodzą krótkie boczne łańcuchy połączone z nim za pomocą wiązań β -1,6 (rycina 1):



Ryc. 1. Budowa β -glukanów występujących w ścianie komórkowej drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*)

Fig. 1. The structure of β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*

Pozostała część ściany komórkowej drożdży jest zbudowana z mannozy 31%, białek 13%, lipidów 9% oraz chityny stanowiącej 1–2% ogólnego składu ściany. W zależności od pochodzenia β -glukany wykazują różnice w swojej strukturze i tworzą cząstki liniowe, rozgałęzione oraz cykliczne, co ma istotny wpływ na biologiczną aktywność tych związków. Wyróżnia się dwa główne typy polisacharydów ściany komórkowej: sztywne włóknienkowe polimery chitynowe lub celulozowe, oraz wypełniające wolne przestrzenie α - i β -glukany oraz glikoproteiny. Polisacharydy luźno związane z zewnętrzną warstwą ściany komórkowej, jako rozpuszczalne w wodzie mogą być wydzielane poza komórkę. Jak zaznacza M. Gibiński „ β -glukany stanowią około 50% rozpuszczalnych związków błonnika. Błonnik składa się z celulozy, hemiceluloz i pektyn. Hemicelulozy mają złożoną budowę strukturalną i relatywnie niski ciężar molekularny; złożone są z pentozanów (łańcuchy ksylozy i arabinozy) oraz heksozanów (polimery glukozy, galaktozy i mannozy), których główną frakcją rozpuszczalną w wodzie są β -glukany” [5]. Inną grupę polisacharydów biologicznie czynnych stanowią heteroglikany, które dzieli się na galaktany, fukany, ksyłany i mannany na podstawie składników cukrowych tworzących ich szkielet. Łańcuchy boczne heteroglikanów mogą zawierać arabanozę, mannozę, fukozę, galaktozę, ksylozę, kwas glukuronowy i glukozę jako główne składniki połączone ze sobą w różny sposób.

Wykazano [5, 9], że rozpuszczalny w wodzie błonnik, tj. β -glukan zmniejsza ryzyko chorób cywiliza-

cyjnych takich jak otyłość, choroby wieńcowe, nadciśnienie oraz nowotwory (hamują proliferację komórek nowotworowych, między innymi poprzez inhibicję procesu angiogenezy [10]). Związki te wykazują działanie immunostymulujące i przeciwbakteryjne (posiadają zdolność stymulowania odporności organizmu przeciw infekcjom wywołanym przez różnorodne patogeny: Gram-dodatnie i Gram-ujemne bakterie, grzyby, wirusy i pasożyty), intensyfikują proces fagocytozy i wytwarzanie czynników prozapalnych, eliminujących infekcję, działają przeciwzapalnie, przeciwpłucniczo, obniżają poziom glukozy i cholesterolu LDL we krwi [11].

β -D-glukany z długimi rozgałęzionymi łańcuchami bocznymi, stanowią także bardzo istotną grupę prebiotyków stymulujących wzrost i aktywność pożądaną, naturalnej flory jelitowej, a jednocześnie hamujących przy tym rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych (*E. coli*, *Salmonella* spp.). Odnotowano wpływ β -glukanów na wzrost aktywności przeciwnowotworowej, natomiast w terapii nowotworów piersi wskazano na szybsze wyleczenie stanów zapalnych i miejsc poddanych działaniu promieniowania, tzw. efekt radioprotektywny [10].

Wśród wielu funkcji, jakie może pełnić β -glukan w organizmie, istotną rolę odgrywa on jako antyoksydant [12]. Dzienna dawka prozdrowotna β -glukanu powinna wynosić co najmniej 2 mg na 1 kg masy ciała. Jak podaje M Gibiński „FDA przyjęło zalecenie spożywania 3 g β -glukanów w ciągu dnia, w połączeniu z 30–35 g włókna pokarmowego, co ma zapewnić wzrost aktywności systemu immunologicznego organizmu przed grozącymi infekcjami „ [5].

Istotną cechą β -glukanu, podobnie jak alginianów, jest ich zdolność do stymulowania biosyntezy kolagenu przez aktywowane fibroblasty. Dzięki temu przyspieszają procesy regeneracji tkanek i uczestniczą w gojeniu się ran. Dodatkowo, mogą być stosowane w kosmetyce do łagodzenia podrażnień skóry i w terapii przeciwzmarszczkowej.

Współczesne wyzwania i zastosowania medyczno-farmaceutyczne wymagają stałego poszerzania spektrum analizowanych związków, a przede wszystkim znajomości ich struktury chemicznej. W Polsce badania na temat składu, struktury chemicznej i właściwości alg oraz β -glukanów roślin rozumiane interdyscyplinarnie (tzw. reakcja Maillarda) są prowadzone rzadko. Glikacja białek z udziałem polisacharydów, tzw. reakcja Maillarda jest wieloetapowym zjawiskiem, zachodzącym w zdrowym i chorym organizmie (choroby degeneracyjne), a także w warunkach *in vitro* w produktach biomedycznych i spożywczych. W świetle raportów prognostycznych do 2025 roku ocenia się, że ok. 300 milionów ludzi zapadnie na cukrzycę, jedną z powszechnych chorób cywilizacyjnych, mających źródła w glikacji [13].

Material i metoda

Obiektem badań były następujące produkty: ziarna owsa, płatki owsiane, drożdże spożywcze, grzyby (bocz-

niak, pieczarka, suszone podgrzybki i maślaki). Jako wzorca β -glukanów użyto suplement diety β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 6)-glukan (1 tabl. zawiera 100 mg β -glukanu); producent: Walmark, a.s. Oldrichovice 44, 739 61 Trinec, Czechy.

Próbki o masie 0,2 g umieszczono w temp. ok. 0°C lodówko-zamrażarce i poddano hydrolizie w 80% H_2SO_4 cz.d.a. przez 24 godziny. Hydrolizat rozcieńczono do 5 cm³ w wodzie destylowanej.

Elektroforezę prowadzono, jak opisano w poprzedniej publikacji [1] w roztworze 0,2 M octanu wapnia (pH = 7,5) przez 1,5 godziny w układzie elektrolitycznym CAE (CA-SYSMINI Cellulose Acetate Systems). Warunki pomiaru: 10 mA, max 240 V, 50 W. Następnie wybarwiono płytki w 0,5% roztworze błękitu toluidyny, odpłukano w wodzie destylowanej i wysuszone na powietrzu.

Widma Ramana roztworów hydrolizatów rejestrowano przy użyciu spektrometru MAGNA-IR 860 z przystawką FT-Raman. Próbkę wzbudzano laserem o długości 1064 nm (model T10-8S Nd YAG laser). Warunki pomiaru: rozdzielczość – 4 cm⁻¹, zakres pomiarowy 100–4000 cm⁻¹. Wyniki badań przedstawiono na rycinach 5–10.

Wyniki i omówienie

Chociaż podstawowe właściwości β -glukanów są dobrze poznane, to współczesne zastosowania medyczne i farmaceutyczne (jako tzw. opatrunki aktywne) wymagają stałego poszerzania spektrum analizowanych związków oraz znajomości ich struktury chemicznej.

Literatura przedmiotu obejmuje badania z wielu pokrewnych dziedzin. Hydrożele na bazie alginianów i glukanów służą do wytwarzania biomateriałów, w tym włókien, nanowłókien, opatrunków aktywnych, tzw. „sztucznej skóry”, konstrukcji tkankowych, systemów kontrolowanego dozowania leków, układów membranowych w mikroenkapsulacji [14].

Z punktu widzenia tej pracy, istotne jest stwierdzenie [15–16], że w organizmie produkty zaawansowanej glikacji ((advanced glycation endproducts – AGEs; produkty reakcji Maillarda) powodują zmiany konformacji przestrzennej białek, sieciowania oraz powstawanie wiązań poprzecznych. Glikacja białek w organizmie nasila się w stanach zwiększonego stężenia cukru we krwi oraz w przebiegu stanów zapalnych. Produkty niniejszej reakcji mogą być również identyfikowane w warunkach stresu oksydacyjnego (np. proces starzenia się organizmu, oparzenie, rany innego pochodzenia).

Cukry redukujące, np. glukoza, w tzw. reakcji Maillarda, reagują z grupami aminowymi białek i zmieniają ich właściwości. Glikacja białek, reakcja Maillarda lub reakcja nieenzymatycznego brązowienia wg Zuwała-Jagiełło [17] jest „wieloetapowym zjawiskiem zachodzącym w organizmie w warunkach prawidłowych”. Prze-

biega także [18–19] w warunkach *in vitro* oraz podczas procesów związanych z przetwarzaniem żywności (termiczne przetwarzanie, długotrwałe przechowywanie żywności) i „prowadzi do powstania związków odpowiedzialnych za smak, zapach oraz atrakcyjność produktów spożywczych i nosi nazwę reakcji maillarda” (została opisana na początku XX wieku) [17].

Zgodnie z informacjami podanymi przez A. Michalską w pracy [19] „Melanoidyny, końcowe produkty reakcji Maillarda są szeroko rozpowszechnione w produktach żywnościowych, którym w wyniku obróbki termicznej nadają brązowy kolor i wpływają na ich jakość. W dużych ilościach występują w kawie, kakao, chlebie i miodzie”. Jak donoszą Lerche i Pischetsrieder w pracy [18] „Struktura chemiczna melanoidyn nie została do końca poznana. Jednym z ważniejszych aspektów dotyczących występowania melanoidyn w żywności są ich właściwości przeciwutleniające, które mogą wpływać na długość okresu przechowywania produktów żywnościowych oraz na fizjologiczne procesy zachodzące *in vivo*. Wiąże się to z działaniem melanoidyn jako substancji wykazujących działanie przeciwutleniające, antymutagenne, obniżające poziom cholesterolu oraz stymulujące wzrost bakterii jelitowych, mogą być również alternatywą w antybiotykoterapii stosowanej przeciw *Helicobacter pylori*, mogą działać jako chelatory metali oraz reduktory”. W tym aspekcie właściwości melanoidyn pokrywają się z właściwościami β -glukanów.

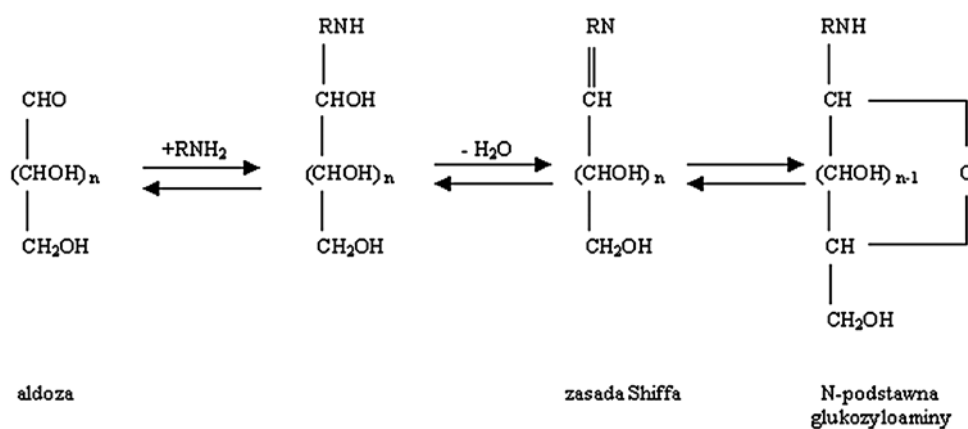
Wczesny etap glikacji białka polega na tworzeniu wiązania między grupą aldehydową cukru, a grupą aminową białka i powstanie zasady Schiffa [19], co przedstawiono na rycinie 2.

Kolejno powstają tzw. produkty przegrupowania Amadori, które jak donosi A Michalska „są prekursorami wielu związków odpowiedzialnych za kształtowanie cech sensorycznych produktów żywnościowych. Jednocześnie procesy cieplnego przetwarzania żywności odpowiadają za obniżenie wartości żywieniowej białek, głównie poprzez blokowanie cennego egzogenego aminokwasu jakim jest lizyna, co prowadzi bezpośrednio do zmniejszenia ilości dostępnej lizyny” [19].

Dalsze przemiany produktów zaawansowanej fazy reakcji Maillarda są zależne od pH środowiska. Z reguły tworzą się toksyczne furfural – gdy w próbce występują pentozy, lub hydroksyfurfural – gdy w próbce występują heksozy. [20].

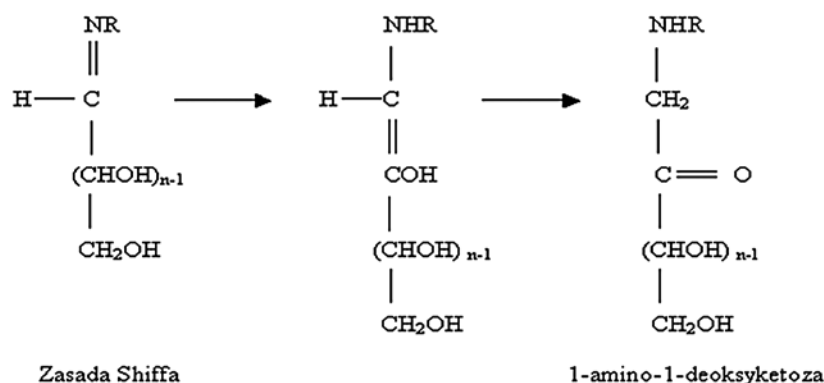
Podczas gotowania lub długotrwałego przechowywania produktów spożywczych, początkowo powstające w nich produkty przegrupowania Amadori mogą, w zależności od czasu i temperatury procesu, ulegać reakcjom degradacji do reaktywnych związków α -dikarbonylowych (glioksal, metyloglioksal) [21]. Kończymy produktem degradacji może być akroleina.

Innymi słowy [16] można wyróżnić trzy etapy reakcji Maillarda: tworzenie odwracalnej, labilnej zasady Schiffa (aldoiminy), powstawanie produktów Ama-



Ryc. 2. Schemat powstania zasady Schiffa

Fig. 2. Schematic representation of the formation of Schiff base



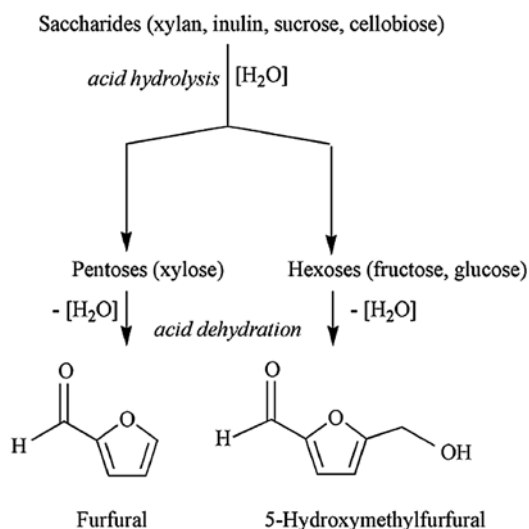
Ryc. 3. Schemat przegrupowania Amadori

Fig. 3. Scheme of Amadori rearrangement

doriego (PPA), tj. związków z reaktywną chemicznie, wolną grupą karbonylową (np. furozyna, fruktozolizyna, laktozolizyna, fruktozoargina) oraz formowanie produktów zaawansowanej glikacji (AGEs).

Produkty glikacji, które pochodzą z diety, wpływają na znaczne zwiększenie ilości AGEs występujących w organizmie [19]. Badania obejmują poszukiwanie inhibitorów reakcji Maillarda, tj. czynników zdolnych do degradacji istniejących już w organizmie AGEs [22]. Np. różne surowce roślinne, m. in. algi *Chlorella*, zielona herbata, czosnek czy drożdże selenowe, zawierają biologicznie czynne substancje o charakterze przeciwutleniaczy i wykazują działanie zapobiegające powstawaniu AGEs [23, 24].

Tak więc, badanie struktur chemicznych i właściwości kolejnych związków wydaje się istotne nie tylko z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności, jej funkcjonalności, ale także współczesnych zastosowań medycznych i farmaceutycznych.



Ryc. 4. Schemat tzw. reakcji Maillarda [20]

Fig. 4. The scheme of Maillard' reaction [20]

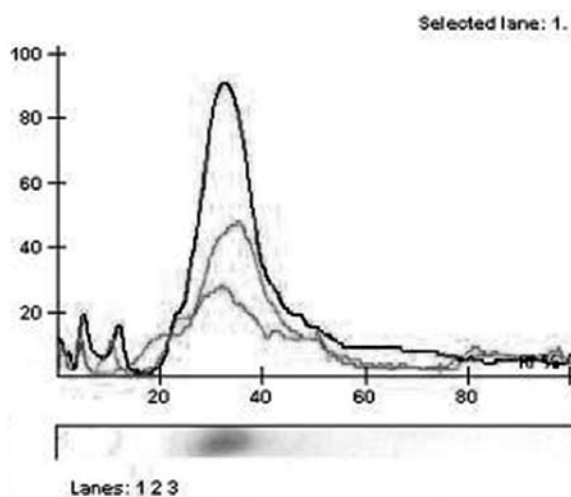
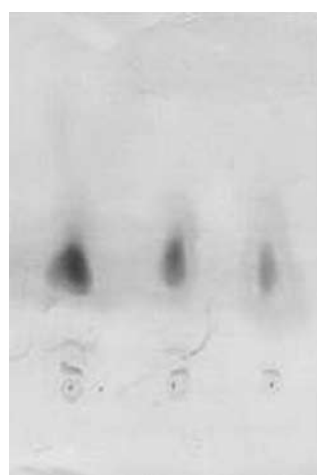
W niniejszej pracy na podstawie analizy zaawansowanych produktów reakcji Maillarda (hydroksyfurfurale – produkty hydrolizy kwaśnej β -glukanów), potwierdzono obecność β -glukanów w następujących produktach: ziarna zbóż, komercyjne płatki owsiane, drożdże spożywcze, grzyby (bocznik, pieczarka, suszone podgrzybki i maślaki). β -glukany identyfikowano po przeprowadzeniu wcześniejszej hydrolizy kwaśnej w 80% kwasie siarkowym (VI). Hydrolizaty oznaczano metodami spektroskopii Ramana oraz elektroforezy w octanie celulozy.

W trakcie hydrolizy kwaśnej cukrów, a więc również β -glukanów, heksozy (glukoza, fruktoza) ulegają konwersji i dochodzi do powstania 5-hydroksymetylfurfuralu, jednego z barwnych produktów reakcji Maillarda. W tych samych warunkach pentozy (np. ksyloza) ulegają konwersji do furfuralu (rycina 4).

Jako substancję wzorcową przeanalizowano próbki β -glukanów, pochodzących ze ścian komórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, farmaceutycznych suplementów diety, firmy Walmark. Na rycinie 5 przedstawiono wyniki oznaczenia hydrolizatów w 80% H₂SO₄ (warunki oznaczenia zamieszczono powyżej w części metodycznej).

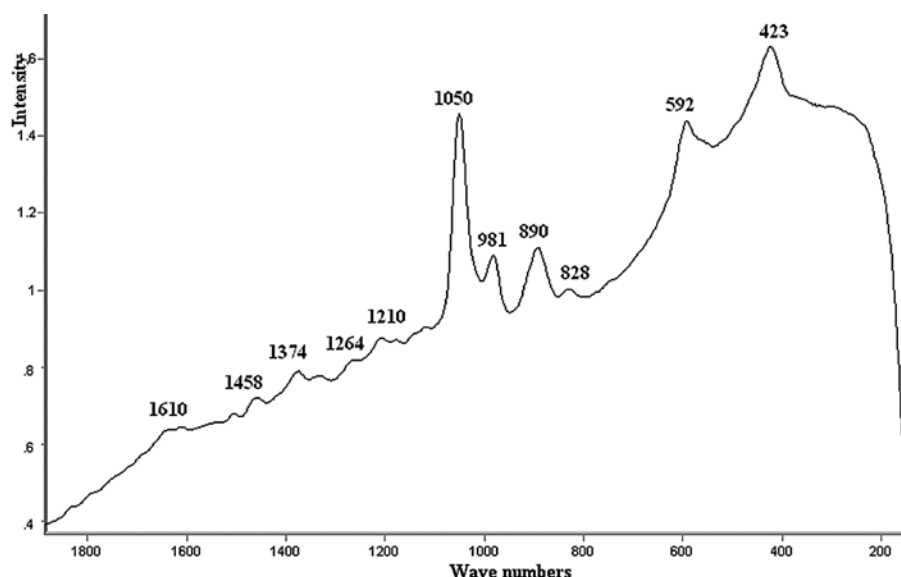
Elektroferogramy próbek przedstawiają pojedyncze, intensywnie wybarwione pasma hydrolizatów β -glukanu roztworów wzorcowych o zmiennej zawartości β -glukanów w badanych próbkach. β -glukany podlegają wyraźnej migracji (wartości współczynnika retencji dla próbek wynoszą kolejno: $R_f = 32\%$; 35% i 32%). Obok (na rycinie 5) przedstawiono przykładową analizę półilościową hydrolizatów, uzyskaną za pomocą programu GELSCAN.

Obliczono powierzchnie pod pasmami wzorców β -glukanu, które dla próbek wynoszą kolejno: 75% ; 75% i 67% . Powierzchnie pod pikami liczono dla wszystkich prób, dla warunków brzegowych $20\text{--}60\%$ wartości współczynnika retencji R_f wyznaczonego na osi X.



Ryc. 5. Elektroferogram β -glukanów na płytkach CAE i analiza półilościowa hydrolizatów. Od lewej do prawej strony: hydrolizaty β -glukanu wzorca: próbki o masie 8 μ g, próbki o masie 4 μ g, próbki o masie 2.6 μ g (naniesiono po 2 μ L próbek)

Fig. 5. Electrophoretogram of β -glucans on cellulose acetate film and semi-quantitative analysis of hydrolysates. From left to right: acid hydrolysate: standard of β -glucans, weight of sample 8 μ g, weight of sample 4 μ g, weight of sample 2.6 μ g, (2 μ L of sample)



Ryc. 6. Widmo Ramana roztworu hydrolizatu β -glukanu wzorca

Fig. 6. Raman spectrum of acid hydrolysate, standard of β -glucans

Na rycinie 6 przedstawiono analizę hydrolizatu wzorca β -glukanów uzyskaną metodą spektroskopii Ramana.

Zgodnie z wiedzą autorów tej pracy, produktów reakcji Maillarda (hydroksyfurfurali – produktów hydrolizy kwaśnej β -glukanów) do tej pory nie identyfikowano metodą spektroskopii Ramana.

Z przeglądu literatury w zakresie polisacharydów wiadomo, że pasma Ramana występują w następujących obszarach: 1458–1464, 1363–1371, 1258–1267, 1118–1131, 1074–1084 i 1040–1048 cm^{-1} i przypisywane są obecności polisacharydów w analizowanych próbkach [25]. Pasma w obszarze 1500–1200 cm^{-1} , a w szczególności pasma 1469, 1330 i 1285 cm^{-1} , zgodnie z literaturą [26] dotyczą wibracji CH_2 , CO, COH, HCO i HCC identyfikowanych na widmie Ramana. Pasma 894–894 cm^{-1} oraz 865 cm^{-1} [26] lub wg innych autorów [27] pasma w rejonie 600–950 cm^{-1} , dotyczą anomerycznej struktury wokół wiązań glikozydowych, w szczególności konfiguracji α i β głównych polisacharydów niniejszej frakcji. Obszary pomiędzy 423–425 cm^{-1} wskazują na obecność w próbce β -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, podczas gdy intensywne pasma przy częstościach 950 i 554 cm^{-1} dotyczą α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów. Identyfikowano także [28] obecność pasm amidowych białek, w tym 1667 cm^{-1} (amid I) oraz 1348–1354 cm^{-1} (amid III). Dla częstości 1657, 1417 i 940 cm^{-1} wskazano obecność pasm chityny. Dla cukrów (1 $\rightarrow$ 4)-D rozróżniono [29] izomery terminalne w pozycjach α -D i β -D przy częstościach 865–837 cm^{-1} α -D i 905–887 cm^{-1} β -D. Pasma ok. 1605 cm^{-1} pochodzi od grup karboksylowych kwasów uroonowych, tworzących także strukturę ściany komórkowej roślin i zbóż. Pasma to wcześniej identyfikowano w ksylanach [30].

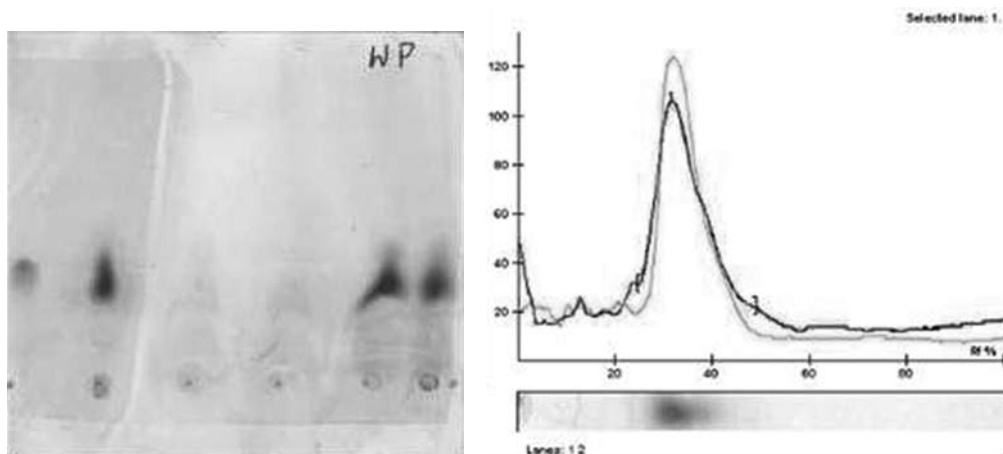
Na widmach Ramana w obszarze 1600–1660 cm^{-1} identyfikuje się (często pomiar uniemożliwia zbyt duża fluorescencja w obszarze NIR) drgania pierścieni aromatycznych [31]. Analizie polisacharydów izolowanych

z materiału roślinnego towarzyszą pasma kwasów fenolowych, białek, pektyn i lignin. Pasma te uwidaczniają się w obszarze 1700–1500 cm^{-1} [30].

Kolejno, dokonano analizy rzeczywistych próbek β -glukanów. Przedstawione na rycinie 7 próbki poddano hydrolizie w 80% H_2SO_4 , w warunkach przedstawionych powyżej w części metodycznej.

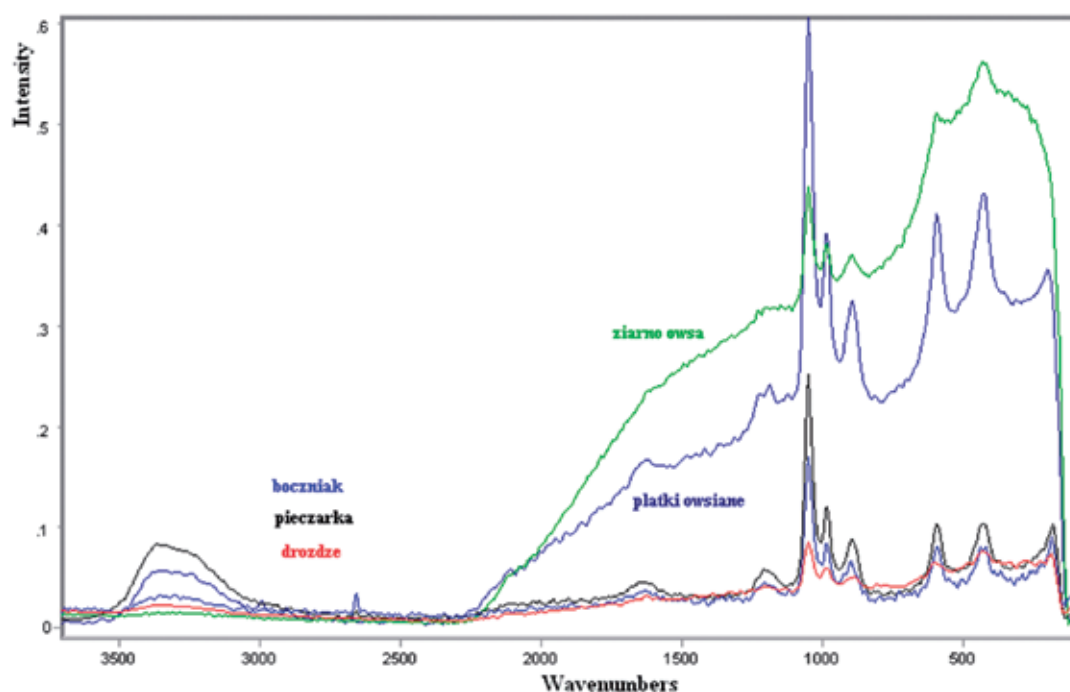
Elektroferogramy próbek przedstawiają pojedyncze, intensywne pasma hydrolizatów β -glukanu wzorca, płatków owsianych i ziarna owsa, oraz znacznie mniej intensywne pasma boczniaka i pieczarki, świadczące o mniejszej zawartości β -glukanów w badanych próbkach. β -glukany podlegają wyraźnej migracji (wartości współczynnika retencji dla próbek płatków owsianych i ziarna owsa wynoszą $R_f = 31\%$ i są zgodne z wartością R_f wzorca β -glukanu). Obok (na ryc. 7) przedstawiono przykładową analizę ilościową hydrolizatów, uzyskaną za pomocą programu GELSCAN. Obliczono powierzchnie pod pasmami hydrolizatów wzorca β -glukanu: 53%, zaś powierzchnia pod pasmem próbek płatków owsianych: 59%, co odpowiada zawartości β -glukanu ok. 8 μg w 1 μL roztworu. Jako porównanie z elektroforezą na rycinie 8 przedstawiono analizę hydrolizatów β -glukanów metodą spektroskopii Ramana.

Typowe widma hydrolizatów β -glukanów, z zachowaniem wszystkich charakterystycznych pasm hydrolizatu wzorca (przedstawione wcześniej na rycinie 6), obserwuje się dla próbek płatków owsianych i ziarna owsa. Można także stwierdzić, porównując intensywności pasm, że dostępność ściany komórkowej ziarna owsa dla kwasu siarkowego (VI) jest znacznie mniejsza, w porównaniu do możliwości penetracji kwasem płatków owsianych. Generalnie jednak profil pasm Ramana hydrolizatów β -glukanów jest podobny, co może być powodem uzyskania niejednoznacznych, dyskusyjnych wniosków.



Ryc. 7. Elektroferogram β -glukanów na płytkach CAE i analiza półilościowa hydrolizatów. Od lewej do prawej strony: barwnik – Amido Black 10B; hydrolizaty: β -glukan – wzorzec, bocznik, pieczarka, płatki owsiane, ziarno owsa (naniesiono po 1 μ L próbek)

Fig. 7. Electrophoretogram of β -glucans on cellulose acetate film and semi-quantitative analysis of hydrolysates. From left to right: dye – Amido Black 10B; acid hydrolysate: standard of β -glucans, mushrooms: *Pleurotus ostreatus*, *Fungus*, oatmeal, oat (1 μ L of sample)



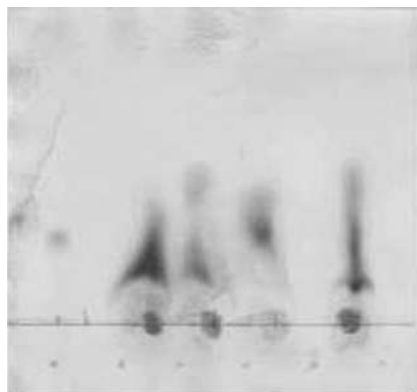
Ryc. 8. Widmo Ramana roztworów hydrolizatów następujących próbek: bocznik, pieczarka, płatki owsiane, ziarno owsa i drożdże

Fig. 8. Raman spectrum of acid hydrolysate: mushrooms: *Pleurotus ostreatus*, *Fungus*, oatmeal, oat and *Saccharomyces cerevisiae*

Metoda elektroforezy jako samodzielna technika analityczna może służyć natomiast do szybkiej i taniej identyfikacji prób ziół, alg i roślin. Przykład takiej porównawczej procedury analitycznej pokazano na rycinie 9: przykładowy elektroferogram hydrolizatów alg brunatnicy i morskizynu oraz malwy. Elektroferogramy hydrolizatów polisacharydów budujących ściany komórkowe alg (np. fukoidyna) i roślin, można łatwo odróżnić od hydrolizatów β -glukanów.

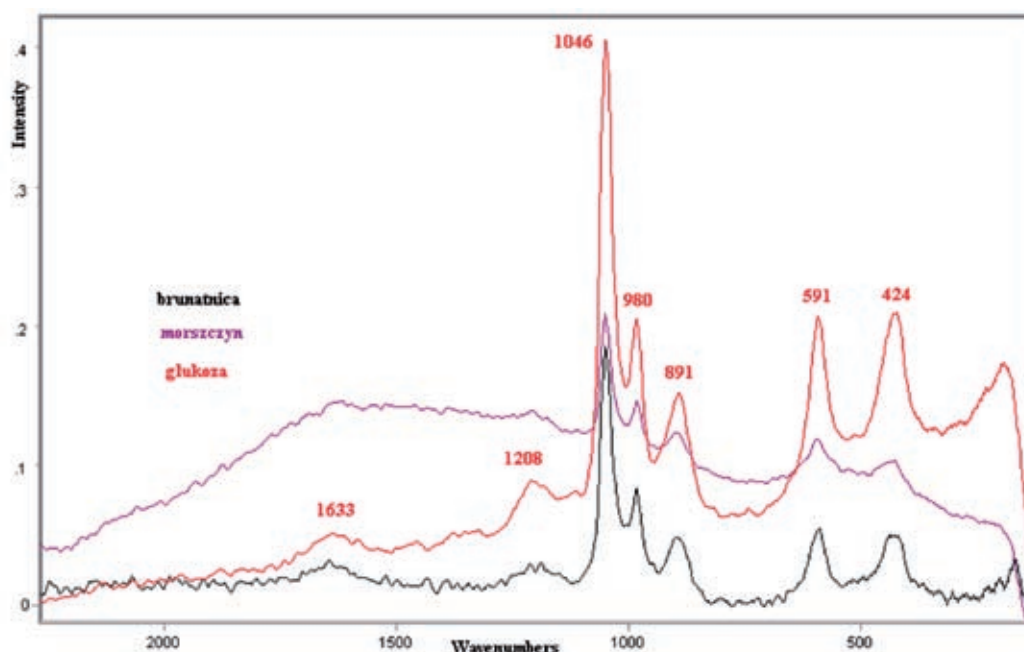
Typowe widma hydrolizatów polisacharydów budujących ściany komórkowe alg (brunatnica, morskizyn) przedstawiono na rycinie 10.

Generalnie profil pasm Ramana hydrolizatów próbek przedstawionych na rycinie 10 jest podobny. Dlatego też metoda spektroskopii Ramana, w ogólnym ujęciu nie może być samodzielną techniką analizy taksonomicznej hydrolizatów, produktów reakcji Maillarda. Ocena subtelnych zmian strukturalnych (np. w obrębie wiązań wodorowych) będzie przedmiotem dalszych badań.



Ryc. 9. Elektroferogram hydrolizatów β -glukanów na płytkach CAE. Od lewej do prawej strony: barwnik – Amido Black 10B; hydrolizaty: brunatnica, morszczyn, płatki owsiane, malwa (naniesiono po 1 μ L próbek)

Fig. 9. Electrophoretogram of β -glucan hydrolysates on cellulose acetate. From left to right: dye – Amido Black 10B; acid hydrolysate: brown algae, *Fucus vesiculosus* L, oatmeal, mallow-malwa (1 μ L of sample)



Ryc. 10. Widmo Ramana roztworów hydrolizatów następujących próbek: D-glukoza, brunatnica, morszczyn

Fig. 10. Raman spectrum of acid hydrolysate: mushrooms: D-glucose, brown algae, *Fucus vesiculosus* L

Wnioski

Glikacja białek z udziałem polisacharydów, tzw. reakcja Maillarda, jest wieloetapowym zjawiskiem zachodzącym w zdrowym i chorym organizmie (choroby degeneracyjne), a także w warunkach *in vitro* w produktach biomedycznych i spożywczych.

Na podstawie analizy produktów reakcji Maillarda w niniejszej pracy stwierdzono obecność β -glukanów,

po przeprowadzeniu wcześniejszej hydrolizy kwaśnej w 80% kwasie siarkowym (VI), w następujących produktach: ziarna owsa, płatki owsiane, drożdże spożywcze, grzyby (bocznik, pieczarka, suszone podgrzybki).

Hydrolizaty oznaczano metodami spektroskopii Ramana oraz elektroforezy w octanie celulozy, co stanowi przykład taksonomicznej klasyfikacji i detekcji niniejszych produktów.

Literatura

- [1] Pielesz A., Biniś W., Paluch J.: Mild acid hydrolysis of fucoidan: characterization by electrophoresis and FT-Raman spectroscopy. Carbohydrate Research (2011) 346, 1937–1944.
- [2] Johansson L., Virkki L., Maunu S., et al.: Structural characterization of water soluble β -glucan of oat bran. Carbohydrate Polymers (2000) 42, 143–148.
- [3] Malinowska E., Krzyczkowski W., Herold F.: Pozyskiwanie, budowa i działanie biologiczne polisacharydów grzybowych na przykładzie soplówki jeżowatej (*Herichium erinaceum*). Biotechnologia (2008) 1, 80, 109–121.
- [4] Ishurd O., Zgheel F., Elghazoun M., et al.: A novel (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucan isolated from the fruits of *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. Carbohydrate Polymers (2010) 82, 848–853.
- [5] Gibiński M.: β -glukany owsa jako składnik żywności funkcjonalnej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość (2008) 2, 57, 15–29.
- [6] Augustin J., Jaworska G., Dandar A., Cejpek K.: Bocznik ostrygowaty jako źródło β -D-glukanów. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość (2007) 6, 55, 170–176.

- [7] Synytsya A., Micková K., Synytsya A., et al.: Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* (2009) 76, 548–556.
- [8] Saluk-Juszczak J., Królewska K.: β -Glukan drożdży *Saccharomyces cerevisiae* –naturalny stymulator układu immunologicznego. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*. (2010) 59, 1–2, 151–160.
- [9] Wursch P., Pi-Sunyer F. X.: The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. *Diabetes Care*. (1997) 20, 1774–1780.
- [10] Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q.: Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology* (2007) 18, 4–19.
- [11] Bohn J.A., Bemiller J. N.: (1–3)-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polym.* (1995) 28, 1, 3–14.
- [12] Lange E.: Produkty owsiane jako żywność funkcjonalna. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*. (2010) 3, 70, 7–24.
- [13] Thomas M. C., et al.: The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr. Drug Targets* (2005) 6, 453–474.
- [14] Rinaudo M.: Advances in Characterization of Polysaccharides in Aqueous Solution and Gel State. in: S. Dumitriu Ed., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, Marcel Dekker, New York, (2005) 237–252.
- [15] Basta G.: Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atheroscler.* (2008) 196, 9–21.
- [16] Yan S. F., Ramasamy R., Schmidt A. M.: Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* (2008) 4, 285–293.
- [17] Zuwała-Jagiello J.: Terapia chorób z udziałem końcowych produktów zaawansowanej glikacji w ich patogenezie. *Pol. Merk. Lek.* (2009) 27, 158, 152.
- [18] Lerche H., Pischetsrieder M., Severin T.: Maillard reaction of D-glucose: identification of a colored product with conjugated pyrrole and furanone rings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) 50, 2984–2986.
- [19] Michalska A., Zieliński H.: Produkty Reakcji Maillarda w Żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. (2007) 2, 51, 5 – 16.
- [20] Lima S., Antunes M.M., Fernandes A., et al.: Acid-Catalysed Conversion of Saccharides into Furanic Aldehydes in the Presence of Three-Dimensional Mesoporous Al-TUD-1. *Molecules* (2010) 15, 3863–3877.
- [21] Silvan M. J., Van De Lagemaat J., Olano A., Del Castillo M. D.: Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in food. *J. Pharmaceut. Biomed.* (2006) 41, 1543–1551.
- [22] Reddy V. P., Beyaz A.: Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* (2006) 11, 646–654.
- [23] Babu P.V.A., Sabitha K.E., Srinivasan P., et al.: Green tea attenuates diabetes induced Maillard-type fluorescence and collagen cross-linking in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Pharmacol. Res.* (2007) 55, 433–440.
- [24] Yamagishi S., Nakamura K., Inoue H.: Therapeutic potentials of unicellular green alga *Chlorella* in advanced glycation end product (AGE)-related disorders. *Med. Hypotheses* (2005) 65, 953–955.
- [25] Edwards H. G. M., Russell N. C., Weinstein R., Wynn-Williams D. D.: Fourier transform Raman spectroscopic study of fungi. *Journal of Raman Spectroscopy* (1995) 26, 911–916.
- [26] Matsuihiro B.: Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. *Hydrobiologia* (1996) 326/327, 481–489.
- [27] Bell A. F., Hecht H., Barron L. D.: Disaccharide solution stereochemistry from vibrational raman optical activity. *Journal of American Chemical Society* (1994) 116, 5155–5161.
- [28] Focher B., Naggi A., Torri G., Cosani A., Terbojevich M.: Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions-evidence from CP-MAS ^{13}C NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* (1992) 17, 97–102.
- [29] Zhang X., Zhang L., Xu X.: Morphologies and conformation transition of Lentinan in aqueous NaOH solution. *Biopolymers* (2004) 75, 187–195.
- [30] Kacurakova M., Wellner N., Ebringerova A.: Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocolloids* (1999) 13, 35–41.
- [31] Evans P. A.: Differentiation «hard» from «soft» woods using Fourier transform infrared and Fourier transform Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta* (1991) 47A, 9/10, 1441–1447.

Adres do korespondencji

Akademia Techniczno-Humanistyczna
Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku
Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych
ul. Willowa 2
43-309 Bielsko-Biała
e-mail: apielez@ath.bielsko.pl